

**Zum Mechanismus der Translokation von Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum der Hefe**



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium

im Promotionsfach Biologie  
Spezialisierung Zellbiologie

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biochemikerin Kathrin Plath  
geboren am 2. Mai 1971 in Brandenburg/Havel

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:

Prof. Dr. Dr. h.c. Hans Meyer

Dekan der Fakultät:

Prof. Dr. Jürgen P. Rabe

Gutachter:

1. Prof. T. A. Rapoport
2. Prof. E. Hartmann
3. Prof. Andreas Herrmann

Tag der Einreichung beim Promotionsausschuss:

14. Mai 1999

Tag der mündlichen Prüfung:

23. Juli 1999

## ZUSAMMENFASSUNG

In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* können Proteine entweder co- oder posttranslational durch die Membran des Endoplasmatischen Retikulum transportiert werden. Sie besitzen eine Signalsequenz, die sie zu einem hydrophilen Kanal in der Membran bringt, durch den der Transport erfolgt. Die zentrale Komponente des Translokationsapparates in der Membran ist der aus den Untereinheiten Sec61p, Sbh1p und Sss1p bestehende Sec61p-Komplex. Beim Protein-transport wirkt der Sec61p-Komplex zusammen mit anderen Faktoren: Im cotranslationalen Transport geht er eine feste Bindung mit Ribosomen ein; der posttranslationale Transport erfordert die Assoziation mit dem tetrameren Sec62/63p-Komplex unter Bildung des sogenannten Sec-Komplexes.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Struktur des Sec61p-Komplexes durch Elektronen-mikroskopie analysiert. Er liegt in Detergenzlösung in ringförmigen Strukturen mit einem Durchmesser von ~82Å und einer zentralen Pore von ~21Å vor. Jeder Ring besteht aus drei oder vier heterotrimeren Sec61p-Komplexen. Die oligomeren Ringstrukturen des Sec61p-Komplexes entsprechen vermutlich proteinleitenden Kanälen der Membran des Endoplasmatischen Retikulum. In Membranen wird ihre Bildung durch die Bindung von Ribosomen oder die Interaktion mit dem Sec62/63p-Komplex induziert. Eine dreidimensionale Struktur, die durch Kryo-Elektronen-mikroskopie erhalten wurde, zeigt, daß das Ribosom so an den Sec61p-Komplex bindet, daß der Tunnel im Ribosom, durch den die naszierende Polypeptidkette das Ribosom verläßt, genau in die zentrale Pore des Sec61p-Oligomers mündet. Es existiert also ein kontinuierlicher Kanal, der sich vom Peptidyltransferase-Zentrum im Ribosom durch die zentrale Pore des Sec61p-Oligomers erstreckt, durch den naszierende Polypeptidketten cotranslational direkt in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulum transportiert werden könnten.

In dieser Arbeit wurde ein dem Sec61p-Komplex verwandter heterotrimerer Komplex in der Membran des Endoplasmatischen Retikulum identifiziert, der aus den Untereinheiten Ssh1p, Sbh2p und Sss1p besteht. Sss1p ist beiden trimeren Komplexen gemein; Ssh1p und Sbh2p sind homolog zu Sec61p bzw. Sbh1p. Durch Deletion von Ssh1p und Sbh2p wurde gezeigt, daß der Ssh1p-Komplex wie der Sec61p-Komplex am Transport von Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum beteiligt ist. Der Ssh1p-Komplex ist mit membrangebundenen Ribosomen assoziiert und bildet in Detergenzlösung oligomere Ringstrukturen, aber interagiert nicht mit dem Sec62/63p-Komplex. Wir postulieren daher, daß der Ssh1p-Komplex ausschließlich den cotranslationalen Transport von Proteinen vermittelt.

Beim posttranslationalen Transport interagiert das vollständig synthetisierte Modellsubstrat Prepro-Alphafaktor mit vielen cytosolischen Proteinen. Die cytosolischen Chaperone Hsp70 und TRiC konnten als Interaktionspartner identifiziert werden. Bei der Bindung des Prepro-Alphafaktors an die Membran werden die cytosolischen Proteine freigesetzt. Wir verwendeten einen Photoquervernetzungsansatz, um zu untersuchen, wie die Signalsequenz des Prepro-Alphafaktors im Bindungsschritt durch den Sec-Komplex erkannt wird. Die Signalsequenz-bindungsstelle wird hauptsächlich von Sec61p gebildet und befindet sich an der Grenzfläche zur Lipiddoppelschicht. Die gebundene Signalsequenz ist in einer helikalen Struktur fixiert und wird auf gegenüberliegenden Seiten von den Transmembrandomänen 2 und 7 des Sec61p umgeben. Sec62p und Sec71p, zwei Untereinheiten des Sec62/63p-Komplexes, flankieren gemeinsam eine Seite der Signalsequenzhelix, befinden sich aber in größerer Entfernung zur Signalsequenz als Sec61p. Es wird ein Modell vorgeschlagen, das beschreibt, wie die Bindung der Signalsequenz den Translokationskanal für den Transport öffnen könnte.

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
- Der cotranslationale Proteintransport in das Endoplasmatische Retikulum	5
- Der posttranslationale Proteintransport in das Endoplasmatische Retikulum	11
- Der Transport von Proteinen durch die Plasmamembran von <i>E.coli</i>	17
- Aufgabenstellung	18
<b>2. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE</b>	<b>20</b>
2.1. Der Sec61p-Komplex bildet oligomere Ringstrukturen, die vermutlich proteinleitenden Kanälen der ER-Membran entsprechen	20
- Experimentelle Herangehensweise	20
- Der Sec61p-Komplex liegt in Form oligomerer Ringstrukturen vor	22
- Das Sec61p-Oligomer bindet an den Austrittsort der naszierenden Kette am Ribosom	24
2.2. Der dem Sec61p-Komplex verwandte heterotrimere Ssh1p-Komplex spielt eine Rolle beim cotranslationalen Proteintransport in das ER der Hefe	25
- Ssh1p, Sbh1p und Sbh2p sind für den Proteintransport von Bedeutung	25
- Ssh1p und Sbh2p sind Bestandteile eines heterotrimeren Komplexes	27
2.3. Die Erkennung der Signalsequenz im posttranslationalen Transportmodus	28
- Experimentelle Herangehensweise	28
- Signalsequenz-abhängige Interaktionen des Prepro-Alphafaktors mit dem Sec-Komplex	30
- Die Signalsequenz-Bindungsstelle befindet sich an der Grenzfläche des Translokationskanals und der Lipiddoppelschicht	31
- Die Signalsequenz wird hauptsächlich von Sec61p erkannt	32
- Die Transmembrandomänen 2 und 7 des Sec61p flankieren die Signalsequenz auf gegenüberliegenden Seiten	33
- Der unmittelbar der Signalsequenz folgende Bereich der Polypeptidkette kontaktiert hauptsächlich die Transmembrandomäne 8 von Sec61p	35
2.4. Die cytosolischen Interaktionspartner des Prepro-Alphafaktors werden bei seiner Bindung an den Sec-Komplex freigesetzt	35
<b>3. DISKUSSION</b>	<b>37</b>
3.1. Der posttranslationale Transport in das ER der Hefe	37
- Die Interaktionen des Translokationssubstrats Prepro-Alphafaktor im Cytosol, vor seiner posttranslationalen Translokation in das ER	37
- Die Bindung des Prepro-Alphafaktors an den Sec-Komplex	38
- Die Erkennung der Signalsequenz innerhalb der Membran - ein proteinvermittelter Prozeß	38
- Die Insertion des Polypeptidkette in den Kanal und der anschließende Transport durch die Membran	39

3.2. Die Signalsequenzerkennung durch Sec61p ist evolutionär konserviert .....	40
3.3. Die Assemblierung des Translokationskanals und die Erkennung der Signalsequenz sind vermutlich aufeinanderfolgende Schritte beim co- und posttranslationalen Transport in das ER der Eukaryonten .....	42
3.4. Die Öffnung des Translokationskanals im co- und posttranslationalen Transportprozeß .....	44
- Die Signalsequenz öffnet vermutlich den Kanal.....	45
- Ein Modell, das die Öffnung des Kanals durch die Signalsequenz erklärt.....	45
- Zusätzliche Signale könnten bei der Öffnung des Kanals eine Rolle spielen .....	47
3.5. Die Schließung des Translokationskanals .....	48
3.6. Mögliche Funktionen der beiden zur Signalsequenz vernetzbaren Proteine Sec62p und Sec71p im posttranslationalen Transport.....	50
3.7. Die Interaktion zwischen dem Sec61p-Komplex und dem Ribosom beim cotranslationalen Transport.....	52
3.8. Die co- und posttranslationale Translokation von Proteinen in das ER der Hefe - der neu-entdeckte Ssh1p-Komplex und die Rolle der Sbh1p-Untereinheit des Sec61p-Komplexes .....	54
<b>4. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>57</b>
<b>5. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>67</b>
<b>6. ANHANG.....</b>	<b>68</b>
EIGENANTEIL AN DEN VORGESTELLTEN ARBEITEN.....	68
ERKLÄRUNG .....	70
LEBENS LAUF .....	71
VERÖFFENTLICHUNGEN .....	72
DANKSAGUNG.....	73
<b>7. ANLAGEN.....</b>	<b>74</b>
7.1. Hanein, D., Matlack, K.E., Jungnickel, B., Plath, K., Kalies, K.U., Miller, K.R., Rapoport, T.A., Akey, C.W. (1996). Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. Cell 87:721-732.	
7.2. Finke, K. *, Plath, K. *, Panzner, S., Prehn, S., Rapoport, T.A., Hartmann, E., Sommer, T. (1996). A second trimeric complex containing homologs of the Sec61p complex functions in protein transport across the ER membrane of <i>S. cerevisiae</i> . EMBO J. 15:1482-1494. (*both authors contributed equally to this work)	
7.3. Plath, K., Mothes, W., Wilkinson, B.M., Stirling, C.J., Rapoport, T.A. (1998). Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane. Cell 94:795-807.	

- 7.4. Das Sec61p-Oligomer bindet an den Austrittsort der naszierenden Kette am Ribosom
- 7.5. Die cytosolischen Interaktionspartner des Prepro-Alphafaktors werden bei seiner Bindung an den Sec-Komplex freigesetzt

## 1. EINLEITUNG

Eukaryontische Zellen unterscheiden sich von prokaryontischen Zellen in ihrer intrazellulären Organisation. Im Gegensatz zu der prokaryontischen Zelle, die nur aus einem einzigen, von der Plasmamembran umgebenen intrazellulären Kompartiment besteht, ist die eukaryontische Zelle in viele, sich funktionell unterscheidende membranumschlossene Kompartimente, wie den Zellkern, das Endoplasmatische Retikulum (ER), den Golgi-Apparat, die Lysosomen, Peroxisomen, Mitochondrien und andere, unterteilt. Die Plasmamembran muß eine entscheidende Voraussetzung für die Entstehung des Lebens gewesen sein, dagegen war die Kompartimentierung von Zellfunktionen in membranumschlossenen Organellen offensichtlich erst für die Entwicklung komplexer multizellulärer Organismen notwendig.

Die durch die Lipiddoppelschicht der Membranen erfolgende Abgrenzung des Zellinneren vom extrazellulären Raum sowie der intrazellulären Kompartimente voneinander ermöglicht die Speicherung und Konzentrierung von Stoffen und erlaubt den Ablauf von Stoffwechselprozessen in einem geeigneten Milieu. Um Leben zu ermöglichen, dürfen Membranen jedoch nicht nur eine Barriere darstellen, sondern müssen auch einen selektiven und gerichteten Stoffaustausch mit der Umgebung erlauben. Dieser Austausch wird durch spezifische Transportsysteme vermittelt, die von Membranproteinen gebildet werden.

In der eukaryontischen Zelle hat sich ein komplexes Proteintransport- und Sekretionssystem entwickelt. Alle Proteine der eukaryontischen Zelle, die über den sekretorischen Transportweg an ihren Bestimmungsort gebracht werden, müssen zunächst durch die Membran des Endoplasmatischen Retikulum transportiert oder im Falle von integralen Membranproteinen in diese inseriert werden (Palade, 1975). Anschließend können sie durch Transportvesikel in die verschiedenen Kompartimente des exo- und endocytotischen Transportweges oder in den extrazellulären Raum gelangen. Proteine durchqueren die Membran des Endoplasmatischen Retikulum in einem entfalteten Zustand und werden im Lumen dieser Organelle gefaltet. Außerdem können dort Untereinheiten miteinander assembliert, Disulfidbrücken ausgebildet, Oligosaccharide auf die Aminogruppen bestimmter Asparaginseitenketten übertragen und bestimmte Proteine der Plasmamembran an ihrem C-Terminus kovalent mit einem Glycosyl-Phosphatidylinositol-Molekül verknüpft werden.

Einige elementare Prinzipien des Transports von Proteinen durch die Membran des Endoplasmatischen Retikulums sowie einige an diesem Prozeß beteiligte Komponenten sind evolutionär konserviert und lassen sich von dem Proteinexport durch die Plasmamembran von

Bakterien ableiten. Dieses Phänomen läßt sich möglicherweise dadurch erklären, daß das Lumen des Endoplasmatischen Retikulum topologisch dem extrazellulären Raum einer prokaryontischen Zelle entspricht. Der Transport von

sekretorischen Proteinen durch die Membran hat sich offensichtlich von der Plasmamembran der Prokaryonten in das Endoplasmatische Retikulum der Eukaryonten verlagert. Der Transport von Proteinen durch eine Membran stellt die Zelle generell vor das Problem, sehr große Moleküle unter Erhalt der Permeabilitätsbarriere der Membran zu befördern.

In den beiden verwandten Transportprozessen wird das Targeting eines Proteins aus dem Cytosol zur Membran sowie der anschließende Transport durch die Membran durch ein Signal in dem Protein, die sogenannte Signalsequenz, ausgelöst (Blobel und Dobberstein, 1975; zur Übersicht: Gierasch, 1989 und Martoglio und Dobberstein, 1998). Signalsequenzen befinden sich im Allgemeinen am N-Terminus der zu transportierenden Proteine (die auch als Preproteine oder Precursoren bezeichnet werden) und haben eine Länge von 15-30 Aminosäuren. Sie werden noch während der Membranpassage auf der trans-Seite der Membran durch die membran-gebundene Signalpeptidase abgespalten. Obwohl die Primärstruktur der Signalsequenzen nicht konserviert ist, können drei charakteristische Bereiche unterschieden werden: ein positiv geladener N-Terminus, ein 7-16 Aminosäuren langer zentraler hydrophober Bereich und eine polare C-terminale Region, die die Signalpeptidaseschnittstelle definiert (von Heijne, 1985). Die Gesamthydrophobizität ist für die Funktion einer Signalsequenz von entscheidender Bedeutung (Chou und Kendall, 1990, von Heijne, 1985). Im Falle von Membranproteinen, die keine Signalsequenzen besitzen, übernimmt gewöhnlich die erste Transmembrandomäne die Funktion der Signalsequenz. Transmembrandomänen unterscheiden sich von Signalsequenzen vor allem durch den längeren hydrophoben Bereich (20-30 Aminosäuren) und das Fehlen einer Signalpeptidaseschnittstelle. Offensichtlich sind die Komponenten der Transportmaschinerie in der Lage, hydrophobe Signalsequenzen variabler Länge und Aminosäurezusammensetzung in spezifischer Weise zu erkennen. Wie dieses Prinzip in der Zelle realisiert wird, ist weitgehend unverstanden (siehe unten, auch Zheng und Gierasch, 1996).

Der durch die Signalsequenz initiierte Transportprozeß kann auf zwei unterschiedliche Weisen erfolgen. Man spricht von einem cotranslationalen Mechanismus, wenn Proteine während ihrer Synthese an membrangebundenen Ribosomen durch die Membran gelangen. Dagegen werden Proteine beim posttranslationalen Transport erst nach ihrer Fertigstellung im Cytosol zur Membran gebracht. In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* kommen beide Mechanismen in großem Ausmaß vor. Einige Proteine werden nur cotranslational (z.B. Dipeptidylamino-Transferase B), andere dagegen nur posttranslational (z.B. Prepro-Alphafaktor), und wiederum andere auf

beiden Wegen (z. B. Kar2p) transportiert (Hansen und Walter, 1988; Ng et al., 1996). Studien, in denen die Signalsequenzen von Proteinen gegeneinander ausgetauscht wurden, zeigten, daß allein die Signalsequenz darüber entscheidet, welcher Weg gewählt wird (Feldheim und Schekman, 1994; Ng et al., 1996). Cotranslational transportierte Proteine besitzen offensichtlich hydrophobere Signalsequenzen als posttranslationale Transportsubstrate (Ng et al., 1996). Während in höheren Eukaryonten Proteine vor allem cotranslational in das Endoplasmatische Retikulum gelangen, werden Proteine in dem Bakterium *Escherichia coli* überwiegend posttranslational transportiert. Der cotranslationale Mechanismus könnte in *E.coli* allerdings für die Integration von Membranproteinen von Bedeutung sein (Ulbrandt et al., 1997).

Signalsequenzen bringen Proteine entweder zu dem co- oder zu dem posttranslationalen Translokationsapparat in der Membran. Die zentrale Komponente sowohl des co- als auch des posttranslationalen Translokationsapparates ist ein aus drei integralen Membranproteinen bestehender Komplex, der in der ER-Membran der Eukaryonten als Sec61p-Komplex und in der Plasmamembran von *E.coli* als SecYEG-Komplex bezeichnet wird (zur Übersicht: Ito, 1995 und Rapoport et al., 1996; Abbildungen 1 und 3). Die  $\alpha$ -Untereinheiten (Sec61 $\alpha$  in Säugern, Sec61p in *S. cerevisiae* und SecY in *E.coli*) weisen deutliche Sequenzhomologien auf und besitzen zehn Transmembrandomänen gleicher Topologie (Akiyama und Ito, 1987; Görlich et al., 1992; Wilkinson et al., 1996). Auch die kleinen  $\gamma$ -Untereinheiten (Sec61 $\gamma$  in Säugern, Sss1p in *S. cerevisiae* und SecE in *E.coli*) sind miteinander verwandt. Das Sss1p der Hefezellen kann funktionell durch das Säugerhomologe Sec61 $\gamma$  ersetzt werden (Hartmann et al., 1994). Beide Proteine und SecE der meisten Bakterien durchspannen die Membran mit einem Segment nahe dem C-Terminus einmal.

	Säuger Sec61p-Komplex	<i>S.cerevisiae</i> Sec61p-Komplex	<i>E.coli</i> SecYEG-Komplex
$\alpha$ -Untereinheit	Sec61 $\alpha$	Sec61p	SecY
$\beta$ -Untereinheit	Sec61 $\beta$	Sbh1p	SecG
$\gamma$ -Untereinheit	Sec61 $\gamma$	Sss1p	SecE

#### Abbildung 1

##### Übersicht über die Komponenten des Sec61p/SecYEG-Komplexes in den verschiedenen Organismen

Die  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten der trimeren Komplexe sind in allen Organismen konserviert, die zueinander homologen  $\beta$ -Untereinheiten der Eukaryonten besitzen keine Ähnlichkeit zu dem SecG von *E.coli*.



Das SecE von *E.coli* besitzt dagegen drei Transmembrandomänen. Die für die Funktion essentielle Region besteht allerdings auch nur aus einem Transmembransegment sowie einigen umgebenden Aminosäuren und ist in ihrer Sequenz den  $\gamma$ -Untereinheiten der Eukaryonten homolog (Schatz et al., 1991; Hartmann et al., 1994; Murphy und Beckwith, 1994). Die dritte Untereinheit der heterotrimeren Komplexe wird in Säugern als Sec61 $\beta$ , in *S. cerevisiae* als Sbh1p und in *E.coli* als SecG bezeichnet. Die zueinander homologen Proteine Sec61 $\beta$  und Sbh1p der Eukaryonten sind durch eine Transmembrandomäne in der Membran verankert und besitzen keine Ähnlichkeit zu der prokaryontischen Untereinheit SecG, die die Membran zweimal durchspannt (Nishiyama et al., 1993; Panzner et al., 1995; Toikkanen et al., 1996).

Eine Funktion der Untereinheiten der heterotrimeren Komplexe beim Transport von Proteinen konnte unter anderem durch genetische Studien in *E.coli* und in *S.cerevisiae* gezeigt werden. Die  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten, d.h. Sec61p und Sss1p bzw. SecY und SecE, sind essentielle Proteine dieser Organismen (Schatz et al., 1991; Stirling et al., 1992; Esnault et al., 1993; Duong und Wickner, 1997). Mutationen in den Genen dieser Proteine oder die Depletion von Sss1p führen zur Akkumulation von Translokationssubstraten im Cytosol (Deshaies und Schekman, 1987; Schatz et al., 1989; Stirling et al., 1992; Esnault et al., 1993). Darüber hinaus kann der Translokationsdefekt einer *sec61* Mutante und der Exportdefekt einer dominant-negativen *secY* Mutante durch die Überexpression von Sss1p bzw. SecE aufgehoben werden (Shimoike et al., 1992; Esnault et al., 1993). SecG, die dritte Untereinheit des SecYEG-Komplexes, ist nicht essentiell in *E.coli*. Die Deletion des *secG* Gens führt jedoch zu einer starken Wachstums-hemmung und deutlichen Translokationsdefekten bei tiefen Temperaturen (Nishiyama et al., 1994). Sbh1p, die dritte Untereinheit des Sec61p-Komplexes der Hefe, wurde biochemisch als Bestandteil des heterotrimeren Komplexes identifiziert, aber nicht in genetischen Screens gefunden. Die Rolle dieser Untereinheit beim Proteintransport ist bisher *in vivo* nicht untersucht worden.

In einem *in vitro* System, das den Signalsequenz-abhängigen Proteintransport mit gereinigten Komponenten rekonstituiert, ist der Sec61p/SecYEG-Komplex die einzige Proteinkomponente in der Membran, die allen Transportwegen gemein ist und für den Membrantransfer aller Proteine benötigt wird (Brundage et al., 1990; Görlich und Rapoport, 1993; Panzner et al., 1995). Ein weiterer ubiquitärer Bestandteil aller Translokationsorte sind Lipidmoleküle. Sowohl für den Sec61p/SecYEG-Komplex als auch für Lipide gibt es Hinweise auf eine mögliche Interaktion mit Signalsequenzen: Es konnte gezeigt werden, daß Signalsequenzen beim cotranslationalen Transport von Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum der Säuger innerhalb der Membran erkannt werden (Jungnickel und Rapoport, 1995). Für diesen Schritt ist im Falle des

Modellproteins Preprolaktin der Sec61p-Komplex in der Lipidmembran notwendig und hinreichend (Jungnickel und Rapoport, 1995; siehe unten). In *E.coli* wurden Mutationen, die die Sekretion von Proteinen mit defekten oder sogar fehlenden Signalsequenzen erlauben (sogenannte *prl* Mutationen; *prl* für protein localization), in den Genen der drei Untereinheiten des SecYEG-Komplexes gefunden (Emr et al., 1981; Osborne und Silhavy, 1993; Stader et al., 1989; Bost und Belin, 1997). Experimente mit synthetischen Signalpeptiden zeigten, daß funktionelle Signalsequenzen, im Gegensatz zu nicht-funktionellen, mit künstlichen Lipiddoppelschichten interagieren und lokale Änderungen in der Lipidstruktur induzieren können (Briggs et al., 1985; Killian et al., 1990).

Man nimmt an, daß der heterotrimere Sec61p/SecYEG-Komplex den Kanal in der Membran bildet, durch den Proteine transportiert werden (siehe unten). Der Kanal interagiert in den verschiedenen Transportprozessen mit verschiedenen Faktoren, die unter anderem die Proteine zum Kanal führen oder die Energie für den gerichteten Transport von Proteinen liefern.

### ***Der cotranslationale Proteintransport in das Endoplasmatische Retikulum***

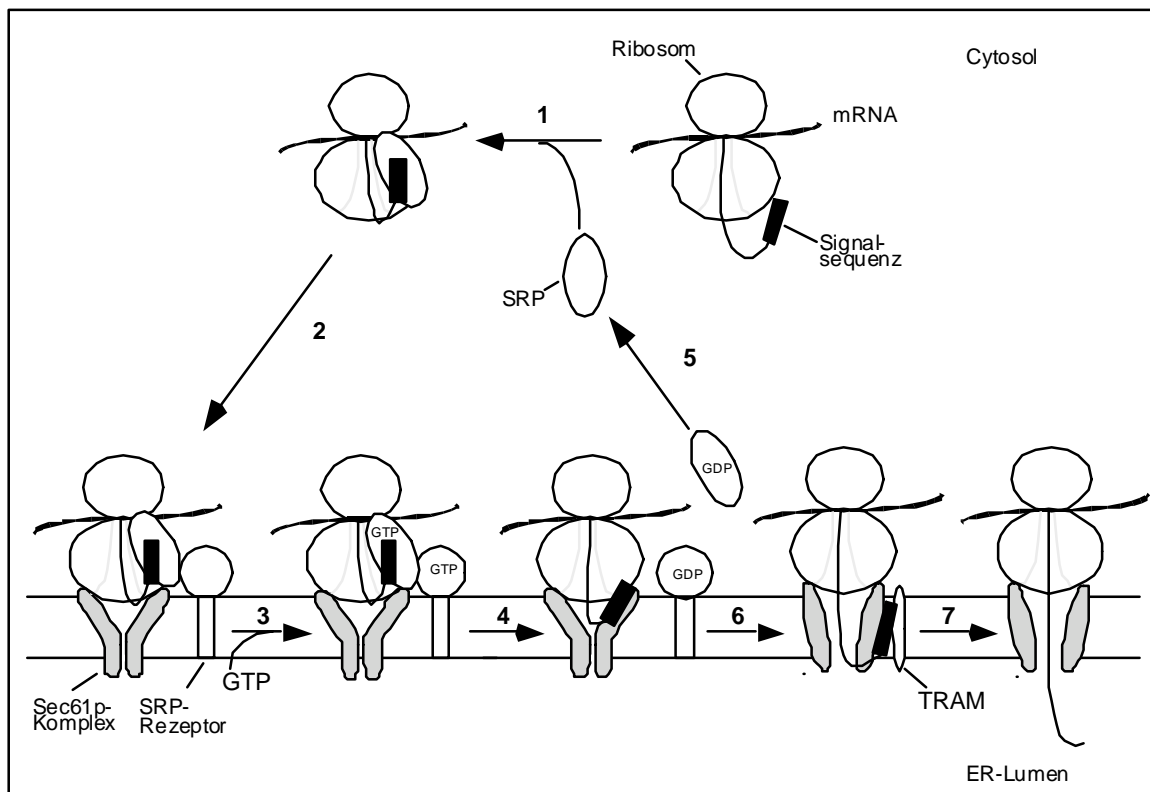
Der cotranslationale Transport von Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum ist am besten in einem *in vitro* Säugersystem untersucht. Eine wichtige Voraussetzung für die Untersuchung von Transportwegen ist die Schaffung definierter Translokationsintermediate. Im Falle des cotranslationalen Transports können verkürzte mRNAs, denen das Terminationskodon fehlt, benutzt werden, um Ribosomen-gebundene naszierende Polypeptidketten definierter Längen zu erzeugen, da die Ketten als Peptidyl-tRNA mit dem Ribosom verbunden bleiben (Gilmore et al., 1991). Führt man die Synthese in Gegenwart von Membranen des Endoplasmatischen Retikulum durch, stellt das Translationsintermediat auch ein Translokationsintermediat dar.

Das nachfolgend beschriebene Modell des cotranslationalen Proteintransports in das ER leitet sich vor allem von Daten aus dem Säugersystem ab (Abbildung 2). Der Transportprozeß wird im Cytosol durch das Signalsequenz-Erkennungspartikel SRP (engl. signal recognition particle) eingeleitet (zur Übersicht: Walter und Johnson, 1994; Millman und Andrews, 1997). Es bindet an die Signalsequenz der naszierenden Kette sobald diese aus der großen Untereinheit des Ribosoms austritt (Walter et al., 1981; Bernabeu et al., 1983). Diese Interaktion führt gleich-zeitig zu einer hochaffinen Bindung des SRP an das Ribosom und zu einem Translationsarrest (Walter et al., 1981; Walter und Blobel, 1981). SRP ist ein längliches Ribonukleoproteinpartikel aus einer 7S RNA und sechs unterschiedlichen Polypeptiduntereinheiten (Walter und Blobel, 1980; 1982). Die 9kD- und 14kD-Untereinheiten an einem Ende des SRP-Moleküls sind für den

Elongationsarrest verantwortlich (Siegel und Walter, 1986). Die eigentliche Erkennung und Bindung der Signalsequenz wird durch die Methionin-reiche Domäne der 54kD-Untereinheit (SRP54) am anderen Ende des Partikels vermittelt (Krieg et al., 1986; Kurzchalia et al., 1986; Zopf et al., 1990; High und Dobberstein, 1991; Lütcke et al., 1992). Man nimmt an, daß die Signalsequenzbindungsstelle von einer hydrophoben Tasche gebildet wird, in die die Seitenketten der auf den hydrophoben Seiten amphipathischer Helices liegenden Methionine hineinragen (Bernstein et al., 1989; Keenan et al., 1998). Die Seitenketten der Methionine sind im Gegensatz zu den verzweigten Seitenketten vergleichbar hydrophober Aminosäuren relativ flexibel. Sie könnten eine hydrophobe Oberfläche ausreichender Formbarkeit schaffen, die sich den variablen Signalsequenzstrukturen anpassen kann.

Im nächsten Schritt des Targetingprozesses gelangt der aus Ribosom, naszierender Kette und SRP gebildete Komplex an die ER-Membran, indem er auf zweifache Weise mit ihr interagiert: Zum einen bindet SRP an seinen aus den zwei Untereinheiten  $SR\alpha$  und  $SR\beta$  bestehenden Membranrezeptor (Gilmore et al., 1982, Meyer et al., 1982), zum anderen das Ribosom an den Sec61p-Komplex (Görlich et al., 1992; Kalies et al., 1994; Jungnickel und Rapoport, 1995). Die Funktion des Sec61p-Komplexes als Ribosomenrezeptor erfordert einen Mechanismus, der die Signalsequenz-abhängige Bindung von Ribosomen an den Translokationsort in der Membran sichert. Es wurde gezeigt, daß Ribosomen, die naszierende Ketten mit funktionellen Signalsequenzen synthetisieren, bei der Bindung an den Translokationsort in der Membran durch den SRP-abhängigen Targetingprozeß einen selektiven Vorteil gegenüber solchen Ribosomen besitzen, die nicht über SRP zur Membran geleitet werden (Neuhof et al., 1998; Raden und Gilmore, 1998).

Der SRP-Targetingzyklus ist an mehreren Stellen reguliert. Beide Untereinheiten des SRP-Rezeptors und die 54kD-Untereinheit des SRP sind GTPasen (Bernstein et al., 1989; Connolly und Gilmore, 1989; Römisch et al., 1989; Miller et al., 1995). Sobald SRP an seinen Membranrezeptor bindet, wird es durch die kooperative Bindung von GTP an SRP54 und  $SR\alpha$  von der Signalsequenz und dem Ribosom freigesetzt und damit der Translationsarrest aufgehoben (Connolly und Gilmore, 1989; Rapiejko und Gilmore, 1997). Die naszierende Kette kann nun in den Translokationsort der Membran inserieren und in den eigentlichen Transportprozeß eintreten. Die anschließende Hydrolyse von GTP führt zur Dissoziation des SRP von seinem Rezeptor, womit beide für einen neuen Targetingzyklus bereitstehen (Connolly et al., 1991; Rapiejko und Gilmore, 1997). SRP54 und  $SR\alpha$  sind vermutlich GTPase-aktivierende Proteine füreinander (Powers und Walter, 1995).

**Abbildung 2****Modell des cotranslationalen Proteintransports durch die ER-Membran der Säuger**

Die Signalsequenz eines sekretorischen Proteins wird im Cytosol durch SRP erkannt, sobald sie aus dem Ribosom heraustritt (Schritt 1). Der Komplex aus Ribosom, naszierender Kette und SRP gelangt über zwei Affinitäten zur ER-Membran: Zum einen bindet SRP an seinen Membranrezeptor, zum anderen das Ribosom an den Sec61p-Komplex (Schritt 2). Durch die kooperative Bindung von GTP an SRP54 und die  $\alpha$ -Untereinheit des SRP-Rezeptors (Schritt 3) wird SRP von der Signalsequenz und dem Ribosom freigesetzt (Schritt 4). Die GTP-Hydrolyse führt zur Dissoziation des SRP von seinem Rezeptor, womit beide für einen neuen Targetingzyklus bereitstehen (Schritt 5). Mit einem zweiten Signalsequenzerkennungsschritt inseriert die naszierende Kette produktiv in den Translokationskanal, der vermutlich von dem Sec61p-Komplex gebildet wird. Gleichzeitig erfolgt die Öffnung des Kanals zum ER-Lumen (Schritt 6). Der N-Terminus der naszierenden Kette liegt nun in einer Haarnadelkonformation vor. Ein Teil der Schleife wird von der Signalsequenz gebildet, der andere von dem C-terminal nachfolgenden Abschnitt der Polypeptidkette (Shaw et al., 1988; Mothes et al., 1994; Martoglio et al., 1995). Die Signalsequenz kontaktiert in dieser Konformation Sec61 $\alpha$  und TRAM sowie Membranlipide, der nachfolgende Abschnitt nur Sec61 $\alpha$  (High et al., 1993; Mothes et al., 1994; Martoglio et al., 1995; Mothes et al., 1998). Mit der weiteren Elongation der Polypeptidkette wird der C-terminale Bereich der Schleife durch die Membran geschoben, bis die Signalpeptidaseschnittstelle auf der luminalen Seite der ER-Membran für die Signalpeptidase zugänglich wird und die Signalsequenz abgespalten werden kann (Schritt 7). Der Rest der Polypeptidkette wird mit der fortlaufenden Synthese direkt aus einem Kanal im Ribosom durch die Membran in das Lumen des ER transportiert. Die naszierende Kette wird dabei in der Membran ausschließlich von Sec61 $\alpha$  umgeben.

Im Anschluß an die Targetingphase wird die naszierende Kette während ihrer Synthese an membrangebundenen Ribosomen durch einen hydrophilen Kanal in der Membran in das Lumen des ER transportiert. Die Tatsache, daß naszierende Ketten sekretorischer Proteine mit Harnstoff aus der ER-Membran extrahiert werden können, war ein erster Hinweis darauf, daß sich naszierende Ketten während ihres Transports durch die Membran in einer polaren Umgebung befinden (Gilmore und Blobel, 1985). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß Fluoreszenz-sonden, die in naszierende Ketten eingebaut sind, während der Membranpassage in einer hydrophilen Umgebung sind (Crowley et al., 1993; 1994). Die Existenz eines hydrophilen, proteinleitenden Kanals wurde später direkt mit zwei unterschiedlichen experimentellen Ansätzen demonstriert. Zum einen konnten in elektrophysiologischen Experimenten große ionenleitende Kanäle in der ER-Membran nachgewiesen werden, nachdem naszierende Polypeptidketten durch Puromycin von den membrangebundenen Ribosomen entlassen wurden (Simon und Blobel, 1991). Zum anderen wurde die Zugänglichkeit von Fluoreszenzsonden in langen naszierenden Ketten membrangebundener Ribosomen untersucht. Diese Sonden sind sogar wenn sie sich noch innerhalb des Ribosoms befinden von der luminalen Seite der ER-Membran aus für relativ große fluoreszenzlöschende Moleküle wie Jodid- oder  $\text{NAD}^+$ -Ionen zugänglich, jedoch nicht vom Cytosol her erreichbar (Crowley et al., 1993; 1994; Hamman et al., 1997). Die naszierende Polypeptidkette befindet sich demnach in einem kontinuierlichen hydrophilen Kanal, der vom Ribosom durch die Membran bis in das Lumen des ER reicht.

Die Insertion der naszierenden Kette in den Translokationskanal verläuft in zwei Schritten (Jungnickel und Rapoport, 1995). Ribosomen mit kurzen naszierenden Ketten (für das Modellprotein Preprolaktin Fragmente <64 Aminosäuren) binden zunächst nur schwach an die Membran. Sie sind durch hohe Salzkonzentrationen von der Membran ablösbar und ihre Ketten sind noch nicht proteaseresistent in den Translokationskanal inseriert. Nach Verlängerung der Kette um einige Aminosäuren wird die Bindung des Ribosoms an die Membran hochsalzresistent. Die naszierenden Ketten sind jetzt durch die Proteine des Translokationskanals vor Proteasen geschützt. Der Übergang von einer schwachen zu einer festen Bindung des Ribosoms an die Membran und die proteaseresistente Insertion der Kette in den Translokationskanal erfordern eine funktionelle Signalsequenz (Jungnickel und Rapoport, 1995). Signalsequenzen werden demnach beim cotranslationalen Transport von Proteinen nicht nur während des Targetings im Cytosol durch SRP erkannt, sondern ein zweites Mal während der Insertion der Kette in den Translokationskanal. Bei derselben Kettenlänge, bei der die Erkennung der Signalsequenz in der Membran erfolgt, öffnet sich der Translokationskanal zum Lumen des ER (Crowley et al., 1994). Fluoreszenzsonden in kürzeren naszierenden Ketten befinden sich in einer hydrophile

Umgebung, sind aber weder vom Cytosol noch vom ER-Lumen für fluoreszenzlöschende Moleküle zugänglich (Crowley et al., 1994).

Die feste Bindung des Ribosoms an den Translokationskanal ist von besonderer Bedeutung für den Ablauf des cotranslationalen Transportprozesses. Da die naszierende Kette direkt aus dem Kanal im Ribosom in den Translokationskanal in der ER-Membran übertragen wird, ist der vektorielle Transport der Polypeptidkette in das ER-Lumen gewährleistet. Die Energie der Proteinbiosynthese liefert automatisch die Energie für den cotranslationalen Transportprozeß. Darüber hinaus wird der Durchtritt kleiner Moleküle durch die Membran und die Exposition der Kette zum Cytosol und damit ihre Faltung im Cytosol verhindert (Crowley et al., 1993; 1994; Hamman et al., 1997). Die Dissoziation des Ribosoms in seine Untereinheiten ist wahrscheinlich ein wichtiges Signal für das Schließen des Translokationskanals am Ende der Translokation (Simon und Blobel, 1991; Hamman et al., 1998).

Zahlreiche Experimente weisen darauf hin, daß der Sec61p-Komplex den Kanal in der ER-Membran bildet, durch den Proteine cotranslational transportiert werden. Eine systematische Quervernetzungsstudie zeigte, daß der reife Teil der naszierenden Kette nach dem Austritt aus dem Ribosom durch eine Umgebung in der Membran transportiert wird, die ausschließlich von der großen Untereinheit des Sec61p-Komplexes gebildet wird (Mothes et al., 1994). Der reife Teil der Kette konnte über einen Bereich von etwa 40 Aminosäuren zu Sec61 $\alpha$  vernetzt werden. Dieser Bereich schloß sich unmittelbar dem Teil der Kette an, der sich noch im Ribosom befand, und ist lang genug, die Membran zu durchspannen (Mothes et al., 1994). Eine Rolle des Sec61p-Komplexes als Kanalbildner deckt sich mit den Daten, die seine Notwendigkeit für den Transport von Proteinen in Proteoliposomen (Görlich und Rapoport, 1993; siehe unten) und seine Funktion als Ribosomenrezeptor beschreiben (Görlich et al., 1992; Kalies et al., 1994). Wie der Sec61p-Komplex den proteinleitenden Kanal in der ER-Membran bildet, ist allerdings unverstanden.

Durch Rekonstitutionsexperimente sind alle für den cotranslationalen Transportprozeß essentiellen Membrankomponenten der ER-Membran der Säuger bekannt (Görlich und Rapoport, 1993). Der Transport des Modellproteins Preprolaktin erfordert nur zwei gereinigte Proteinkomplexe in der Lipidmembran: den SRP-Rezeptor und den Sec61p-Komplex. Es wurde gezeigt, daß der Sec61p-Komplex in der Lipidmembran im Falle des Preprolaktins für die Erkennung der Signalsequenz, die proteaseresistente Insertion der naszierenden Kette in den Kanal und die hochsalzresistente Bindung der translatierenden Ribosomen an die Membran ausreichend ist (Jungnickel und Rapoport, 1995). Der cotranslationale Transport anderer Modellproteine, wie zum Beispiel der des Prepro-Alpha-faktors, erfordert neben dem SRP-

Rezeptor und dem Sec61p-Komplex die Anwesenheit eines dritten Proteins in der Membran, des TRAM (für translocating chain associating membrane protein). TRAM ist ein Glykoprotein (Görlich et al., 1992a), das die ER-Membran vermutlich sechsmal durchspannt. Die strukturellen Eigenschaften, die die TRAM-Abhängigkeit der Translokation für ein sekretorisches Protein bestimmen, liegen allein in der Signalsequenz (Voigt et al., 1996). TRAM wird zusätzlich zum Sec61p-Komplex im Schritt der proteaseresistenten Insertion der naszierenden Kette in den Kanal und der Erkennung der Signalsequenz benötigt, jedoch nicht in dem vorausgehenden Schritt des Insertionsprozesses, der zur schwachen Bindung der Ribosomen an die Membran führt (Voigt et al., 1996). Die produktive Insertion der naszierenden Kette in den Translokations-kanal geht in nativen Membranen mit einer Änderung der Umgebung der Signalsequenz einher: Signalsequenzen kurzer Ketten befinden sich nur in der Nachbarschaft zu Sec61 $\alpha$ , nach ihrer Erkennung kontaktieren sie zusätzlich TRAM (Jungnickel und Rapoport, 1995; Mothes et al., 1998). TRAM konnte generell nur in der Nähe von Signalsequenzen sekretorischer Proteine nachgewiesen werden; nach deren Abspaltung ist kein Kontakt der naszierenden Kette zu TRAM detektierbar (High et al., 1993; Mothes et al., 1994).

Bisher ist kein *in vitro* System etabliert, das den SRP-abhängigen cotranslationalen Transport von Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum der Hefe nachvollzieht. Die Hefe *S.cerevisiae* besitzt jedoch sowohl SRP (Hann und Walter, 1991) als auch den SRP-Rezeptor (Ogg et al., 1992). Darüber hinaus ist der Sec61p-Komplex der Hefe wie der Säugerkomplex mit membrangebundenen Ribosomen assoziiert (Görlich et al., 1992; Panzner et al., 1995). Zur Ablösung dieser Ribosomen vom Sec61p-Komplex ist das Entlassen der naszierenden Ketten mit Puromycin unter Hochsalzbedingungen erforderlich. Man nimmt daher an, daß der Sec61p-Komplex der Hefe ebenso wie der Säugerkomplex den SRP-abhängigen, cotranslationalen Transport von Proteinen vermittelt (Panzner et al., 1995). Überraschenderweise ist die Hefe *S.cerevisiae* ohne SRP oder den SRP-Rezeptor lebensfähig, obwohl starke Wachstumsdefekte auftreten (Hann und Walter, 1991; Stirling und Hewitt, 1992; Ogg et al., 1992; Brown et al., 1994). Nur ein Teil der untersuchten Preproteine akkumulieren im Cytosol der mutierten Hefezellen (Ng et al., 1996). Eine Vielzahl von Proteinen wird in diesem Organismus über einen SRP-unabhängigen Weg in das Endoplasmatische Retikulum transportiert. Dieser SRP-unabhängige Transport erfolgt posttranslational. Es ist zu beachten, daß das Hefeprotein Prepro-Alphafaktor, das cotrans-lational in das ER der Säuger transportiert wird, ausschließlich posttranslational in das ER der Hefe gelangt (Garcia und Walter, 1988).

### ***Der posttranslationale Proteintransport in das Endoplasmatische Retikulum***

Der Mechanismus des posttranslationalen Transports unterscheidet sich von dem des cotranslationalen Transports (zur Übersicht: Corsi und Schekman, 1996; Rapoport et al., 1996). Das Ribosom wird beim posttranslationalen Transport nicht benötigt, da Proteine erst nach ihrer Fertigstellung im Cytosol und Ablösung vom Ribosom in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulum transportiert werden. Andere Komponenten müssen daher die Funktionen des Ribosoms übernehmen und unter anderem die Energie für den Transport liefern, die Permeabilitätsbarriere der Membran während des Transportprozesses aufrechterhalten und dafür sorgen, daß der Proteintransport gerichtet abläuft. Obwohl der posttranslationale Proteintransport in das Endoplasmatische Retikulum der Hefe *S.cerevisiae* *in vitro* nachvollzogen werden kann (zuerst gezeigt von Hansen et al., 1986; Rothblatt und Meyer, 1986; Waters und Blobel, 1986; Hansen und Walter, 1988) und die den Transport vermittelnden Komponenten der Membran bekannt sind (Panzner et al., 1995), ist der Mechanismus des posttranslationalen Transports weniger verstanden als der des cotranslationalen Transports, vor allem da es schwieriger ist, definierte Translokationsintermediate zu erzeugen.

Wie bereits weiter oben erwähnt wurde, bestimmt die Signalsequenz, ob ein Protein co- oder posttranslational in das Endoplasmatische Retikulum gelangt (Feldheim und Schekman, 1994; Ng et al., 1996). Man stellt sich vor, daß SRP die aus dem Ribosom heraustretende naszierende Kette nach einer Signalsequenz abtastet, indem es mit geringer Affinität in einem bestimmten Schritt des Elongationszyklus an das Ribosom bindet (Walter et al., 1981; Ogg und Walter, 1995). Eigenschaften der Signalsequenz, wie ihre Hydrophobizität (Walter et al., 1981; Bird et al., 1987; Ng et al., 1996), könnten darüber entscheiden, ob SRP effektiv mit der Signalsequenz der wachsenden Polypeptidkette interagieren kann. Darüber hinaus könnten kinetische Parameter, wie die Geschwindigkeit der Elongation, eine Rolle spielen, denn die Affinität des SRP zur Signalsequenz nimmt mit steigender Kettenlänge ab (Wiedmann et al., 1987; Siegel und Walter, 1988). Außerdem könnte die Faltung der zu transportierenden Polypeptidkette die Bindung des SRP an die Signalsequenz verhindern. Erkennt SRP die Signalsequenz der naszierenden Kette nicht, wird das Protein vollständig im Cytosol synthetisiert und posttranslational und SRP-unabhängig zur Membran geleitet.

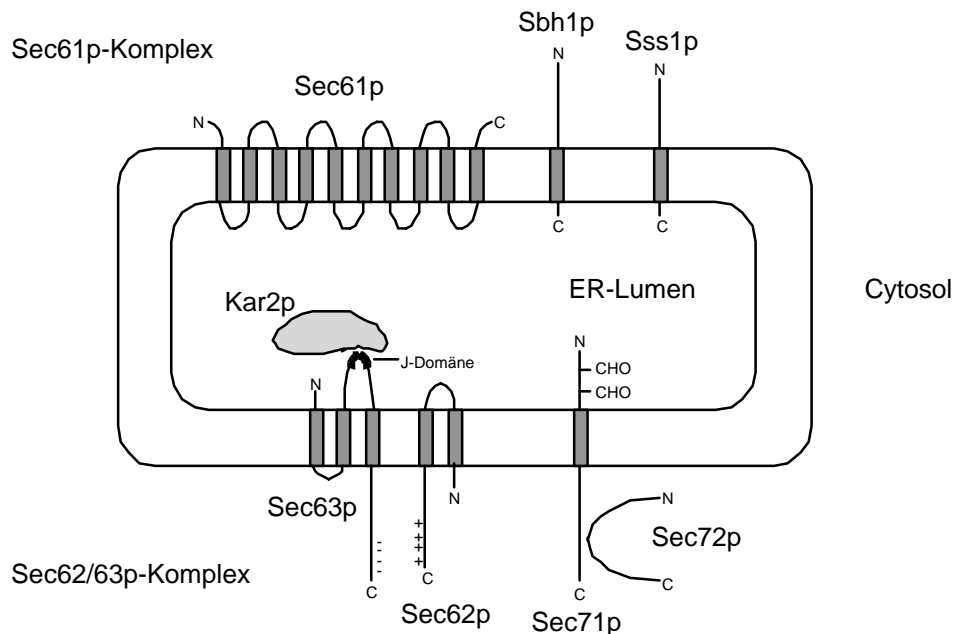
Proteine durchqueren die Membran des Endoplasmatischen Retikulum in einem entfalteten Zustand. Beim cotranslationalen Transport wird die Faltung der naszierenden Kette im Cytosol durch die Kopplung von Synthese und Translokation vermieden. Beim posttranslationalen Transport sind vermutlich cytosolische Chaperone dafür verantwortlich, das Transportsubstrat



im Cytosol in einer teilweise oder vollständig entfalteten Konformation zu halten und gleichzeitig seine Aggregation zu verhindern. Mutationen in Ydj1p, einem DnaJ-Homologen, das zum Teil durch eine Farnesylgruppe auf der cytosolischen Seite der ER-Membran verankert ist, oder die Depletion von verschiedenen cytosolischen Hsp70-Proteinen führen *in vivo* zur Akkumulation von Preproteinen im Cytosol (Deshaies et al., 1988; Caplan et al., 1992). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß Hsp70 und ein bisher nicht identifizierter NEM-sensitiver Faktor des Hefecytosols *in vitro* den posttranslationalen Transport des Modellproteins Prepro-Alphafaktor stimulieren (Waters et al., 1986; Deshaies et al., 1988; Chirico et al., 1988).

Cytosolische Faktoren sind für den posttranslationalen Translokationsprozeß an sich nicht erforderlich. Harnstoff-denaturierter Prepro-Alphafaktor wird ebenso effizient transportiert wie das native Protein (Chirico et al., 1988). Die genannten cytosolischen Chaperone besitzen daher vermutlich keine translokationsspezifische und notwendige Funktion beim posttranslationalen Targeting, sondern halten das Preprotein lediglich in einer translokationskompetenten Konformation. In Übereinstimmung damit beeinflussen Hsp70 und Ydj1p nicht nur den posttranslationalen Transport von Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum, sondern auch den Transport von Proteinen in Mitochondrien, der ein ganz anderes Targetingsignal erfordert (Deshaies et al. 1988; Caplan et al., 1992). Durch Coimmunopräzipitation konnte gezeigt werden, daß Hsp70 direkt mit dem Prepro-Alphafaktor interagiert (Chirico, 1992). Wie die Freisetzung der Chaperone vom Substrat mit der Translokation durch die Membran gekoppelt ist, ist allerdings unverstanden. Außerdem ist unbekannt, ob cytosolische Faktoren existieren, die spezifisch das posttranslationale Targeting zur Membran des Endoplasmatischen Retikulum vermitteln. Im Falle des Imports von Proteinen in Mitochondrien ist ein solcher Faktor beschrieben worden (Hachiya et al., 1993).

Der posttranslationale Proteintransport durch die ER-Membran erfordert die Assoziation des Sec61p-Komplexes mit einem weiteren Membranproteinkomplex, dem tetrameren Sec62/63p-Komplex (Deshaies et al., 1991; Panzner et al., 1995; Abbildung 3). Beide Komplexe zusammen bilden den sogenannten Sec-Komplex, der sich als eine stabile Einheit reinigen läßt (Panzner et al., 1995). Der Sec62/63p-Komplex enthält neben den drei integralen Membranproteinen Sec62p, Sec63p und Sec71p das periphere Membranprotein Sec72p, das wahrscheinlich durch seine Bindung an Sec71p auf der cytosolischen Seite der Membran verankert ist (Fang und Green, 1994; Feldheim und Schekman, 1994). Das Glykoprotein Sec71p durchspannt die Membran einmal, Sec62p zweimal und Sec63p dreimal. Die Proteine des Sec62/63p-Komplex wurden ebenso wie Sec61p und Sss1p in genetischen Screens nach Hefemutanten, die in der Sekretion von Proteinen gestört sind, identifiziert. Sec62p und Sec63p sind essentielle Proteine der Hefe



**Abbildung 3**  
**Schematische Darstellung wichtiger Komponenten des Translokationsapparates in der ER-Membran von *S. cerevisiae***

Sec62p und Sec63p interagieren vermutlich über ihre stark geladenen C-terminalen Domänen miteinander. Sec72p ist ein peripheres Membranprotein, das wahrscheinlich über seine Bindung an das Glykoprotein Sec71p in der ER-Membran verankert ist (CHO-bezeichnet eine Glykosylierung). Das luminale Chaperone Kar2p interagiert mit der J-Domäne des Sec63p.

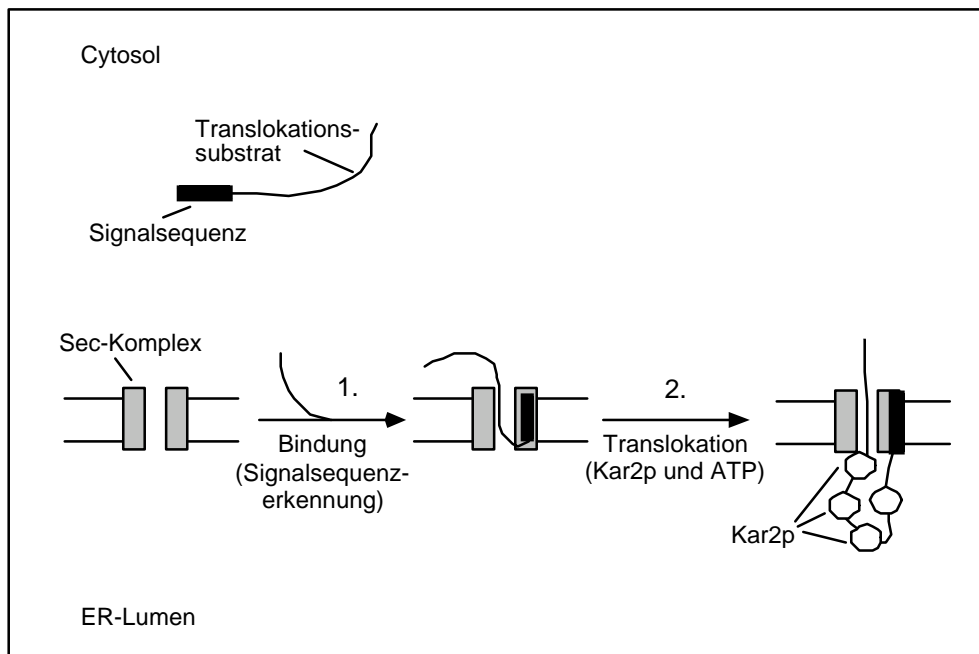
(Deshaies und Schekman, 1989; Sadler et al., 1989). Mutationen in Sec62p oder Sec63p oder die Deletion des *SEC71* oder *SEC72* Gens führen zur Akkumulation von Preproteinen *in vivo* (Deshaies und Schekman, 1989; Rothblatt et al., 1989; Feldheim et al., 1993; Kurihara und Silver, 1993; Feldheim und Schekman, 1994). Die Beziehung zwischen post- und cotranslationalem Transport in der Hefe ist klar: Mutationen in den Proteinen des Sec62/63p-Komplexes verhindern den Transport von posttranslationalen Substraten, Mutationen in SRP oder dem SRP-Rezeptor den von cotranslationalen Substraten (Ng et al., 1996).

Sec63p besitzt eine J-Domäne auf der luminalen Seite der ER-Membran (Sadler et al., 1989), über die es mit dem luminalen Kar2p, einem Protein der Hsp70-Familie, interagiert (Scidmore et al., 1993; Brodsky und Schekman, 1993; Lyman und Schekman, 1995; Corsi und Schekman, 1997). Die Interaktion dieser beiden Proteine gleicht der der homologen Proteine DnaJ und DnaK von *E. coli*. Kar2p ist ein essentielles Protein der Hefe, das für den posttranslationalen Transport von Proteinen in das ER *in vitro* und *in vivo* erforderlich ist (Vogel et al., 1990; Sanders et al., 1992;

Brodsky und Schekman, 1993; Panzner et al., 1995). Der posttranslationale Transport von Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum der Hefe kann *in vitro* mit rekonstituierten Proteoliposomen, die den Sec-Komplex in der Membran und Kar2p und ATP im Lumen enthalten, nachvollzogen werden (Panzner et al., 1995). Proteoliposomen, die neben Kar2p und ATP nur einen der beiden Teilkomplexe des Sec-Komplexes enthalten, sind nicht in der Lage, Proteine posttranslational zu binden (siehe unten) und zu transportieren (Panzner et al., 1995; Matlack et al., 1997). Homologe des Kar2p, Sec62p und Sec63p existieren in höheren Eukaryonten (Normington et al., 1989; Noel und Cartwright, 1994; Brightman et al., 1995). Möglicherweise vermitteln diese Proteine auch in höheren Eukaryonten zusammen mit dem Sec61p-Komplex den posttranslationalen Transport von Proteinen. Im Säugersystem wurde ein posttranslationaler Transport vor allem für Proteine beschrieben, die zu kurz sind, um während ihrer Synthese am Ribosom mit SRP interagieren zu können (Schlenstedt und Zimmermann, 1987; Müller und Zimmermann, 1988).

Der posttranslationale Transport von Proteinen durch die Membran des Endoplasmatischen Retikulum der Hefe erfolgt in zwei Schritten (Sanz und Meyer, 1989; Müsch et al., 1992; Sanders et al., 1992; Lyman und Schekman, 1997; Matlack et al., 1997): Zunächst bindet das Translokationssubstrat in einer Kar2p- und ATP- unabhängigen Weise an die cytosolische Seite des Sec-Komplexes in der Membran. Anschließend sind Kar2p und ATP erforderlich, um die Polypeptidkette durch den Translokationskanal in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulum zu transportieren (Abbildung 4).

Im ersten Schritt des posttranslationalen Proteintransports wird die Signalsequenz des Translokationssubstrats erkannt. Dieser Schritt erfordert eine funktionelle Signalsequenz; Proteine mit defekten Signalsequenzen werden nicht an den Sec-Komplex gebunden (Lyman und Schekman, 1997; Matlack et al., 1997). Die Unterscheidung funktioneller von nicht-funktionellen Signalsequenzen könnte bereits durch cytosolische Faktoren während des posttranslationalen Targetings erfolgen. Gegen diese Annahme spricht jedoch die Tatsache, daß Prepro-Alphafaktor nach seiner Denaturierung mit Harnstoff an den Sec-Komplex bindet, eine Signalsequenzmutante allerdings nicht (Lyman und Schekman, 1997). Durch welche Untereinheiten des Sec-Komplexes Signalsequenzen beim posttranslationalen Transportprozeß erkannt werden, ist unverständlich. Quervernetzungsexperimente zeigten, daß die C-terminale Hälfte des an den Sec-Komplex gebundenen Prepro-Alphafaktors Signalsequenz-abhängig die Proteine Sec62p, Sec71p und Sec72p kontaktiert (Müsch et al., 1992; Lyman und Schekman, 1997). Diese Proteine des Sec62/63p-Komplexes bilden daher möglicherweise den posttranslationalen Signalsequenz-rezeptor in der Membran (Lyman und Schekman, 1997). Die Umgebung der

**Abbildung 4****Modell des posttranslationalen Proteintransports durch die ER-Membran der Hefe *S.cerevisiae***

Die Polypeptidkette wird nach ihrer vollständigen Synthese am Ribosom durch cytosolische Chaperone in einer translokationskompetenten Konformation gehalten und bindet in einer Kar2p- und ATP- unabhängigen Weise an die cytosolische Seite des Sec-Komplexes (Schritt 1). Während des Bindungsschrittes wird die Signalsequenz in der Membran erkannt. Der N-Terminus der Polypeptidkette inseriert vermutlich wie beim cotranslationalen Transport in einer Haarnadelkonformation in die Membran. Der C-terminale Teil der an den Sec-Komplex gebundenen Polypeptidkette befindet sich in Nachbarschaft zu Sec62p, Sec71p und Sec72p. Im zweiten Schritt des Transportprozesses sind Kar2p und ATP auf der luminalen Seite der ER-Membran erforderlich, um die Polypeptidkette in das Lumen des ER zu transportieren. Während der Membranpassage kontaktiert der reife Teil der Polypeptidkette die große Untereinheit des Sec61p-Komplexes. Man nimmt daher in Analogie zum cotranslationalen Transport an, daß das Translokationssubstrat auch beim posttranslationalen Transport durch einen hydrophilen Kanal in der Membran, der vom Sec61p-Komplex gebildet wird, in das ER gelangt. Kar2p wird durch die Interaktion mit der J-Domäne des Sec63p zur Bindung von Peptiden aktiviert. In dem hier dargestellten Modell der molekularen Ratsche bindet Kar2p die Polypeptidkette sobald diese durch Diffusionsprozesse auf der luminalen Seite aus dem Translokationskanal heraustritt und verhindert damit ein Zurückgleiten des Proteins. Die wiederholte Bindung von Kar2p wandelt die Diffusion in einen gerichteten Transportprozeß um. In einem alternativen Modell würde Kar2p gleichzeitig an die J-Domäne und das Translokationssubstrat binden und durch eine Konformationsänderung die Polypeptidkette aktiv durch den Kanal ziehen (Motormodell). Es ist außerdem vorstellbar, daß Kar2p gleichzeitig als molekulare Ratsche und Motor wirkt. Im Verlauf der Translokation wird die Signalsequenz durch die Signalpeptidase auf der luminalen Seite der ER-Membran abgespalten.

Signalsequenz wurde jedoch in diesen Experimenten nicht untersucht. In Analogie zu den verwandten Transportprozessen könnten auch der Sec61p-Komplex oder die Lipidmoleküle der Membran an der Erkennung von Signalsequenzen beteiligt sein (siehe oben). Das etablierte rekonstituierte System aus dem gereinigten Sec-Komplex und Lipiden bietet optimale Voraussetzungen für die Untersuchung der Signalsequenzerkennung in diesem Transportweg.

Im zweiten Schritt des Transportprozesses wird die gebundene Polypeptidkette vermutlich wie beim cotranslationalen Transport durch einen Kanal in der Membran, der von dem Sec61p-Komplex gebildet wird, in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulum transportiert. Unterstützt wird dies dadurch, daß sich der reife Teil der Polypeptidkette während der Membranpassage in der Nachbarschaft der großen Untereinheit des Sec61p-Komplexes befindet (Müsch et al., 1992; Sanders et al., 1992; Lyman und Schekman, 1995; 1997; Matlack et al., 1997). Der vektorielle Transport von Proteinen durch den Translokationskanal wird durch Kar2p vermittelt. Dieser Prozeß erfordert die Hydrolyse von ATP durch Kar2p und die Interaktion von Kar2p mit der J-Domäne des Sec63p (Lyman und Schekman, 1997; Matlack et al., 1997).

Es wurden zwei Modelle vorgeschlagen, um die Wirkungsweise des Kar2p im posttrans-lationalen Transportprozeß zu beschreiben: In dem sogenannten Motormodell bindet Kar2p gleichzeitig an das Translokationssubstrat und die J-Domäne und zieht durch eine Konformationsänderung die Polypeptidkette aktiv durch den Kanal (Glick, 1995). In dem Modell der molekularen Ratsche wird die Diffusion der Polypeptidkette in einen gerichteten Transportprozeß umgewandelt (Simon et al., 1992; Schneider et al., 1994). Dabei bindet Kar2p auf der luminalen Seite des Translokationskanals an die Polypeptidkette und verhindert so ein Zurückgleiten der Kette durch den Kanal. Durch Diffusion der Polypeptidkette und die Bindung weiterer Kar2p-Moleküle resultiert der Transport in das ER-Lumen. Darüber hinaus könnte Kar2p gleichzeitig als Motor und molekulare Ratsche wirken. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß eine molekulare Ratsche *in vitro* für den posttranslationalen Transport des Modellproteins Prepro-Alphafaktor ausreichend ist (Matlack et al., 1999).

Beide Modelle erfordern die Bindung von Kar2p an die zu transportierende Polypeptidkette. Durch chemische Quervernetzung wurde eine Nachbarschaft des Translokationssubstrats zu Kar2p während des Transportprozesses nachgewiesen (Sanders et al., 1992). Kar2p bindet Peptide in seiner C-terminalen Substratbindungstasche. Diese ist geöffnet, wenn ATP an die N-terminale ATPase-Domäne gebunden ist, und geschlossen, wenn ADP gebunden ist (zur Übersicht: Bukau und Horwich, 1998). In Experimenten mit rekombinanten Proteinen konnte gezeigt werden, daß Kar2p durch die J-Domäne des Sec63p für die Bindung von Peptiden aktiviert wird (Misselwitz et al., 1998). Die J-Domäne interagiert dabei mit der ATP-Form des Kar2p und stimuliert dessen ATP-Hydrolyse, wodurch Kar2p mit nur geringer Substratspezifität unmittelbar benachbarte Peptide in seiner Peptidbindungstasche einschließen kann (Misselwitz et

al., 1998). Beim Translokations-prozeß könnte die räumliche Nähe der J-Domäne des Sec63p zur luminalen Öffnung des Kanals gewährleisten, daß Kar2p an die aus dem Translokationskanal heraustretende Polypeptidkette bindet.

### ***Der Transport von Proteinen durch die Plasmamembran von E.coli***

Proteine können posttranslational durch die Plasmamembran von *E.coli* transportiert werden (zur Übersicht: Ito, 1995; Duong et al., 1997). Da bisher keine membrangebundenen Ribosomen nachgewiesen werden konnten, ist unklar, ob ein cotranslationaler Transportmechanismus in diesem Organismus existiert. Allerdings besitzt *E.coli* Homologe des SRP54, der  $\alpha$ -Untereinheit des SRP-Rezeptors und der SRP-RNA (Poritz et al., 1988; Struck et al., 1988; Bernstein et al., 1989; Römisch et al., 1989). Während das SRP von *E.coli* vermutlich eine Rolle bei der Integration von stark hydrophoben Membranproteinen spielt (Ulbrandt et al., 1997), ist es für den Export der meisten extrazellulären Proteine nicht erforderlich (Phillips und Silhavy, 1992). Letztere können durch das cytosolische Chaperon SecB posttranslational zur Plasmamembran geleitet werden. SecB hält das Translokationssubstrat in einer transportkompetenten Konformation, indem es mit dem reifen Teil des Translokationssubstrats interagiert (Randall et al., 1990).

Der Mechanismus des posttranslationalen Proteintransports durch den vermutlich vom SecYEG-Komplex gebildeten Kanal in der Plasmamembran von *E.coli* (Joly und Wickner, 1993) muß sich von dem des posttranslationalen Transports in das Endoplasmatische Retikulum der Hefe unterscheiden, da kein ATP auf der trans-Seite der Membran zur Verfügung steht. Der posttranslationale Transport von Proteinen in *E.coli* erfordert eine Interaktion zwischen dem SecYEG-Komplex und der cytosolischen ATPase SecA. SecA, ein essentielles Protein in *E.coli*, bindet nicht nur an den SecYEG-Komplex, sondern auch an Lipide, an das cytosolische Chaperon SecB, sowie an die Signalsequenz und den reifen Teil des Translokationssubstrats. Das Translokationssubstrat wird von SecB auf das membrangebundene SecA übertragen (Hartl et al., 1990; Lill et al., 1990; Hendrick und Wickner, 1991). Man nimmt an, daß die anschließende Bindung von ATP an SecA eine Konformationsänderung des Proteins induziert, die zu dessen Insertion in die Membran führt (Economou und Wickner, 1994; Economou et al., 1995). Gleichzeitig wird dabei der N-Terminus des Translokationssubstrats in den Kanal transferiert (Schiebel et al., 1991). SecA ist in diesem Zustand von der extrazellulären Seite der Membran aus für Proteasen und modifizierende Reagenzien zugänglich (Kim et al., 1994). Die Freisetzung

des partiell translozierten Substrats und Deinsertion des SecA erfordern die Hydrolyse von ATP (Economou und Wickner, 1994; Economou et al., 1995). Die mehrfache Wiederholung des beschriebenen ATP- abhängigen Insertions- und Deinsertionszyklus des SecA führt schließlich zur vollständigen Translokation der Polypeptidkette. Die Effizienz des Transportprozesses wird durch das elektrochemische Membranpotential deutlich erhöht (Schiebel et al., 1991). Möglicherweise verhindert das Membranpotential ein Zurückgleiten der vom SecA freigesetzten partiell translozierten Polypeptidkette.

Der SecYEG-Komplex ist mit einem weiteren Membranproteinkomplex assoziiert, der die Proteine SecD, SecF und YajC enthält (Duong und Wickner, 1997). Der SecDFyajC-Komplex stabilisiert den membraninserierten Zustand des SecA (Economou et al., 1995; Duong und Wickner, 1997a), ist aber für die Translokation von Proteinen *in vivo* und *in vitro* nicht essentiell.

### **Aufgabenstellung**

Die vorliegende Arbeit untersucht den Transport von Proteinen durch die Membran des Endoplasmatischen Retikulum der Hefe mit biochemischen, genetischen und strukturanalytischen Methoden. Sie unterteilt sich in vier Schwerpunkte:

1. Zahlreiche Experimente deuteten darauf hin, daß der heterotrimere Sec61p-Komplex einen hydrophilen Kanal in der ER-Membran bildet, durch den Proteine entweder co- oder posttranslational in das ER gelangen. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie untersuchten wir, in welcher Struktur der Sec61p-Komplex in Detergenzlösung und in Membranen vorliegt, welche Rolle Ribosomen und der Sec62/63p-Komplex bei der Bildung dieser Strukturen in Membranen spielen, und wo der Sec61p-Komplex an das Ribosom bindet.
2. In der ER-Membran der Hefe existieren homologe Proteine von zwei Untereinheiten des heterotrimeren Sec61p-Komplexes. Die als Ssh1p und Sbh2p bezeichneten Proteine sind homolog zu Sec61p bzw. Sbh1p. Die vorliegende Arbeit ging der Frage nach, ob die beiden neu-entdeckten Proteine Ssh1p und Sbh2p an der Translokation von Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum der Hefe beteiligt sind. Dabei wurde außerdem die Funktion der Sbh1p-Untereinheit des heterotrimeren Sec61p-Komplexes *in vivo* untersucht.
3. Im posttranslationalen Transportprozeß wird die Signalsequenz des Translokationssubstrats im Bindungsschritt durch den Sec-Komplex in der Membran erkannt. Der Mechanismus der Signalsequenzerkennung ist bisher weitgehend unverstanden. Wir wählten einen

Photoquervernetzungsansatz und eine neue “mapping”-Technik, um den Bindungsort der Signalsequenz des Modellsubstrats Prepro-Alphafaktor in der Membran genau zu charakterisieren und damit Hinweise auf den Mechanismus der Signalsequenzerkennung durch den Sec-Komplex zu erhalten. Gleichzeitig wurde untersucht, in welcher Umgebung sich der reife Teil des Prepro-Alphafaktors nach der Bindung an den Sec-Komplex befindet.

4. Beim posttranslationalen Transport sind vermutlich cytosolische Proteine dafür verantwortlich, das Translokationssubstrat in einer translokationskompetenten Konformation zu halten. Wir wählten einen Photoquervernetzungsansatz, um Interaktionen zwischen dem vollständig synthetisierten Prepro-Alphafaktor und cytosolischen Proteinen nachzuweisen, und um zu untersuchen, wie die Freisetzung der cytosolischen Interaktionspartner mit der posttranslationalen Translokation des Prepro-Alphafaktors durch die Membran gekoppelt ist.



## 2. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

### 2.1. Der Sec61p-Komplex bildet oligomere Ringstrukturen, die vermutlich protein-leitenden Kanälen der ER-Membran entsprechen

Zahlreiche Experimente deuteten darauf hin, daß Proteine co- und posttranslational durch einen hydrophilen Kanal in der Membran in das ER gelangen, der von dem heterotrimeren Sec61p-Komplex gebildet wird. Es gibt allerdings keinen direkten Beweis, da in den Experimenten zum Nachweis der Kanäle nicht mit rekonstituierten Proteoliposomen aus gereinigten Komponenten gearbeitet wurde. Wir benutzten die Elektronenmikroskopie, um Informationen über die Struktur des Sec61p-Komplexes zu erhalten, und um herauszufinden, wie der Sec61p-Komplex einen proteinleitenden Kanal bilden könnte (Anlage 1).

#### *Experimentelle Herangehensweise*

Der Sec61p-Komplex und der Sec-Komplex können aus Membranen des rauhen ER der Hefe gereinigt werden (Panzner et al., 1995). Um die Lipidschicht aufzulösen bzw. hydrophobe Interaktionen zu brechen und damit die integralen Membranproteine freizusetzen, werden die Mikrosomen mit dem Detergenz Digitonin extrahiert. Die gelösten Bestandteile befinden sich nach einem Zentrifugationsschritt im Überstand (Digitoninextrakt). Einige Membranproteine bleiben unter den gewählten Bedingungen mit den sedimentierten Ribosomen assoziiert und können in einem zweiten Schritt durch eine Behandlung mit Puromycin und Hochsalz von den Ribosomen abgelöst und mit Digitonin in Lösung gebracht werden (genannt ribosome-associated membrane proteins = RAMPs). Durch den Einbau eines Puromycinmoleküls in die naszierende Polypeptid-kette wird die Proteinsynthese terminiert und die Kette vom Ribosom entlassen.

Der heterotrimere Sec61p-Komplex ist zum Teil mit membrangebundenen Ribosomen assoziiert und daher in der RAMP-Fraktion zu finden. Der größere Teil des Sec61p-Komplexes existiert jedoch in freier Form im Digitoninextrakt. Er kann aus beiden Fraktionen nach demselben Protokoll mit Ionenaustauschern gereinigt werden. Dabei wird der Durchlauf einer Q-Sepharose-Säule an SP-Sepharose gebunden. Der Sec61p-Komplex eluiert von diesem Kation-Austauscher bei ungefähr 450mM Kaliumacetat (Panzner et al., 1995).

Der ausschließlich im Digitoninextrakt vorkommende heptamere Sec-Komplex wird nach einem Protokoll isoliert, das Fraktionierungen an einer das Glykoprotein Sec71p bindenden Concanavalin

A-Säule sowie an einer anti-Sec62p-Matrix einschließt (Panzner et al., 1995). Der gereinigte Sec-Komplex läßt sich mit dem Detergenz Triton X-100 in den heterotrimeren Sec61p-Komplex und den tetrameren Sec62/63p-Komplex dissoziieren. Beide Teilkomplexe können anschließend separat gereinigt werden (Panzner et al., 1995). Der Sec-Komplex stellt somit einen weiteren Ausgangspunkt für die Isolation des heterotrimeren Sec61p-Komplexes dar. In exponentiell wachsenden Hefezellen sind ungefähr 10-20% des Sec61p-Komplexes mit Ribosomen assoziiert, ~40% liegen in freier Form und der Rest in Verbindung mit dem Sec62/63p-Komplex vor.

Die gereinigten Proteinkomplexe in Detergenzlösung können durch Negativkontrastierung oder Kryo-Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht werden. Bei dem elektronenmikroskopischen Verfahren der Negativkontrastierung wird die auf einem Kohlenstoffträger aufgebrachte Probe mit einer Mischung von Form- und Glutaraldehyd fixiert und anschließend mit dem Schwermetall-salz Uranylacetat inkubiert. Sobald die Probe getrocknet ist, überzieht ein dünner Schwermetall-film den Träger überall dort, wo keine Moleküle absorbiert sind und grenzt so deren Oberfläche ab. Da Elektronen organische Moleküle leichter durchdringen als die umgebende Metallschicht, erhält man im Elektronenmikroskop ein sehr kontrastreiches negatives Bild der Oberflächen-struktur der gebundenen Moleküle. Die erreichbare Auflösung ist durch die Größe der Metallpartikel im Färbemittel begrenzt.

Das Verfahren der Kryo-Elektronenmikroskopie hat gegenüber der Negativkontrastierung den Vorteil, daß die native Konformation der Moleküle bewahrt wird und die Darstellung der Innenstruktur dreidimensionaler Objekte möglich ist. Dazu wird die Probe auf einen Kohlenstoff-träger aufgebracht und sehr schnell durch Eintauchen in flüssiges Ethan bei einer Temperatur von -196°C eingefroren, wodurch das in ihr enthaltene Wasser glasartig erstarrt ohne zu kristallisieren. Die Probe kann so ohne Fixierung, Färbung und Trocknung in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Probenhalter im Elektronenmikroskop betrachtet werden. Die Intensität der Bestrahlung wird so niedrig gewählt, daß die auf dem Kohlenstoffträger in unterschiedlichen Orientierungen gebundenen Moleküle gerade sichtbar gemacht, jedoch nicht beschädigt werden. Um Details der molekularen Struktur aufzuklären, müssen unabhängig von dem angewandten Verfahren die Informationen vieler einzelner Partikel durch Bildverarbeitungsverfahren zusammengefaßt werden.

Man verwendet das Verfahren der Gefrierbruch- und Gefrierätz-Elektronenmikroskopie, um Informationen über die Struktur von Proteinkomplexen in Membranen zu erhalten. Zur Rekonstitution in Proteoliposomen werden die Proteinkomplexe in Detergenzlösung mit gereinigten

Lipiden gemischt. Das Detergenz wird durch Adsorption an eine hydrophobe Oberfläche (SM2-Beads bestehend aus Polystyren) aus dem Gemisch entfernt. Die Proteine integrieren dabei spontan in die Lipidschicht der sich bildenden Vesikel (Görllich et al., 1993; Panzner et al., 1995). Die Membranprobe wird äußerst schnell eingefroren und anschließend gebrochen, wodurch die beiden Lipidschichten voneinander getrennt und Membran-durchspannende Proteine exponiert werden. Um die Oberflächenstrukturen der Proteine besser sichtbar zu machen, verringert man die Eisschicht durch Vakuumsublimation von Wasser. Die entstandenen Bruchflächen werden jetzt mit einem dünnen Film aus Platin bedampft. Der Metallabdruck kann nach Ablösung der Probe mit einer starken Säure im Elektronenmikroskop untersucht werden. Da das Metall aus einem bestimmten Winkel aufgebracht wurde, ist der Überzug an einigen Stellen dicker als an anderen, wodurch ein dreidimensionales Bild entsteht.

### ***Der Sec61p-Komplex liegt in Form oligomerer Ringstrukturen vor***

In den ersten Experimenten wurde der aus dem Digitoninextrakt gereinigte Sec61p-Komplex der Hefe in Detergenzlösung elektronenmikroskopisch untersucht. Fast alle Moleküle binden in einer bevorzugten Orientierung an das elektronenmikroskopische Trägernetz und liegen in Form von Ringstrukturen mit einer quasipentagonalen Geometrie vor (Anlage 1; Abbildung 1). Die durch Negativkontrastierung sichtbar gemachten ringförmigen Partikel besitzen einen äußeren Durchmesser von  $\sim 82\text{\AA}$  und eine zentrale Pore von  $\sim 21\text{\AA}$ . In der selten beobachteten Seitenansicht ist der Sec61p-Komplex ein zylinderförmiges Partikel mit einer Höhe von  $\sim 50\text{-}60\text{\AA}$ . Aus dem berechneten Volumen der Partikel und ihrer experimentell ermittelten Masse konnte bestimmt werden, daß jede Ringstruktur drei oder vier heterotrimere Sec61p-Komplexe enthält. Auffällig ist die Variabilität des äußeren Durchmessers der Partikel ( $\sim \pm 2\text{\AA}$ ) und vor allem die des Durchmessers der zentralen Pore ( $\sim \pm 3\text{\AA}$ ). Diese Heterogenität deutet an, daß die Sec61p-Oligomere eine gewisse strukturelle Flexibilität besitzen, die eine variable Zusammensetzung oder unterschiedliche Konformationen der oligomeren Strukturen widerspiegeln könnte.

Wenn der aus dem Digitoninextrakt gereinigte Sec61p-Komplex in Proteoliposomen rekonstituiert wurde, war die Zahl der Ringstrukturen überraschenderweise deutlich reduziert (Anlage 1; Einsatz in Abbildung 3C). Die Integration des Komplexes in die Lipidschicht führt anscheinend zur Dissoziation der in Detergenzlösung beobachteten Oligomere. Da der Sec61p-Komplex im cotranslationalen Transport fest an Ribosomen bindet (Görllich et al., 1992; Jungnickel und Rapoport, 1995) und im posttranslationalen Transport mit dem Sec62/63p-Komplex assoziiert ist (Panzner et al., 1995), ergab sich die Hypothese, daß diese beiden Liganden des Sec61p-Komplexes die Bildung der oligomeren Ringe in Membranen auslösen könnten.

Tatsächlich wird die Zahl der Ringstrukturen in Proteoliposomen, die den aus dem Digitoninextrakt gereinigten Sec61p-Komplex enthalten, durch den Zusatz von Hefe-Ribosomen deutlich erhöht (Anlage 1; Abbildung 3C). Dagegen konnten keine Ringe nachgewiesen werden, wenn Liposomen mit Ribosomen inkubiert wurden. Die in rekonstituierten Proteoliposomen durch Ribosomen induzierten Ringstrukturen des Sec61p-Komplexes sind in Größe und Struktur den in Detergenzlösung beobachteten sehr ähnlich. Sie besitzen wie diese eine zentrale Pore, weisen eine quasipentagonale Geometrie auf und haben einen äußeren Durchmesser von  $\sim 90\text{\AA}$ .

Die Induktion der Ringstrukturen durch Ribosomen ist unabhängig vom Ursprung des Sec61p-Komplexes, da sie in rekonstituierten Membranen nicht nur mit dem aus dem Digitoninextrakt gereinigten sondern auch mit dem aus dem Sec-Komplex isolierten heterotrimeren Sec61p-Komplex beobachtbar ist (Anlage 1; Abbildung 3D). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß ein und derselbe Sec61p-Komplex sowohl den post- als auch den cotranslationalen Transport vermitteln kann.

Oligomere Ringstrukturen konnten ebenfalls in großer Zahl nachgewiesen werden, wenn zusätzlich zum Sec61p-Komplex der Sec62/63p-Komplex in die Membran integriert wurde (Anlage 1; Abbildung 4). Dabei wurden Proteoliposomen analysiert, die entweder den undissoziierten Sec-Komplex oder die beiden aus dem Sec-Komplex isolierten Teilkomplexe zusammen enthalten. Der Sec62/63p-Teilkomplex allein bildet keine Ringstrukturen in Membranen. Auffällig ist, daß der äußere Durchmesser der vom Sec-Komplex gebildeten Ringe mit  $\sim 83\text{\AA}$  in rekonstituierten Membranen dem der Sec61p-Ringe sehr ähnlich ist, obwohl zusätzlich die Membranproteine des Sec62/63p-Komplexes im Sec-Komplex enthalten sind. Aufgrund der vorgeschlagenen Topologien (Abbildung 3 der Einleitung) ist es vorstellbar, daß sich die Hauptmasse der Untereinheiten des Sec62/63p-Komplexes auf der cytosolischen Seite der Membran befindet und daher nach Gefrierbruch nicht in der Membranebene sichtbar ist.

Die in Detergenzlösung und in rekonstituierten Membranen beobachteten oligomeren Ringstrukturen des Sec61p-Komplexes entsprechen wahrscheinlich den proteinleitenden Kanälen der ER-Membran, die zuvor mit elektrophysiologischen und spektroskopischen Methoden im Säugersystem nachgewiesen wurden (Simon und Blobel; 1991; Crowley et al., 1993; 1994). Ein entscheidender Hinweis dafür ist, daß ihre Bildung in Membranen durch die Bindung von Ribosomen bzw. durch eine Interaktion mit dem Sec62/63p-Komplex induziert wird. Die Kanäle wären damit sowohl im co- als auch im posttranslationalen Transport verfügbar. Darüber hinaus liegt die zentrale Pore der Ringstrukturen vermutlich senkrecht zur Membranebene. Die zylinderförmigen Sec61p-Oligomere können in dieser Orientierung mit einer Höhe von  $\sim 50\text{-}60\text{\AA}$

die Lipiddoppelschicht ( $\sim 45\text{\AA}$ ) vollständig durchspannen. Es ist allerdings nicht klar, ob sich die beobachtete zentrale Pore durch das gesamte Partikel erstreckt, oder ob sie nur eine tiefe Einstülpung an einem Ende darstellt. Ringstrukturen, die denen des gereinigten Sec61p-Komplexes gleichen, konnten auch in nativen Membranen des rauen ER nachgewiesen werden (Anlage 1; Abbildung 6).

### ***Das Sec61p-Oligomer bindet an den Austrittsort der naszierenden Kette am Ribosom***

Eine dreidimensionale Struktur des an das Ribosom gebundenen Sec61p-Oligomers unterstützt die Annahme, daß die oligomeren Ringstrukturen des Sec61p-Komplexes proteinleitende Kanäle der ER-Membran darstellen (Anlage 4; auch Beckmann et al., 1997). Um diese dreidimensionale Struktur des Ribosom-Sec61p-Komplexes mit "single-particle"-Kryo-Elektronenmikroskopie und anschließender dreidimensionaler Bildrekonstruktion ermitteln zu können, mußte eine Methode etabliert werden, die die spezifische und effiziente Bindung des Sec61p-Komplexes an Ribosomen und die Entfernung ungebundener Sec61p-Komplexe und freier Ribosomen erlaubt (Anlage 4; Abbildung 1). Dazu wurden gereinigte Ribosomen an den Sec61p-Komplex in der Membran von Proteoliposomen gebunden und die Vesikel anschließend flotiert, um ungebundene Ribosomen abzutrennen. Nach der Solubilisierung der Membranen mit Digitonin konnten die Ribosom-Sec61p-Komplexe durch Sedimentation von den freien Sec61p-Komplexen abgetrennt und anschließend in Digitoninlösung mittels Kryo-Elektronenmikroskopie analysiert werden (Anlage 4; Abbildung 2).

Die dreidimensionale Rekonstruktion des Ribosom-Sec61p-Komplexes (Anlage 4; Abbildung 3) mit einer Auflösung von ungefähr  $30\text{\AA}$  zeigt den Sec61p-Komplex in Übereinstimmung mit den oben beschriebenen Ergebnissen als eine zylinderförmige Struktur mit einem Durchmesser von  $\sim 90\text{\AA}$  und einer Höhe von  $\sim 40\text{\AA}$ . Anstelle der zuvor beobachteten zentralen Pore ist eine leichte Vertiefung sichtbar. Eine kürzlich erhaltene verbesserte dreidimensionale Struktur mit einer Auflösung von  $25\text{\AA}$  zeigt allerdings eine zentrale Pore, die sich durch das gesamte Sec61p-Partikel erstreckt (nicht gezeigte Ergebnisse). Das Sec61p-Oligomer befindet sich in einer Entfernung von  $15\text{-}20\text{\AA}$  zur großen Untereinheit des Ribosoms. Es ist nur an einer einzigen Stelle über eine Ausstülpung direkt mit dem Ribosom verbunden. Eine nähere Analyse des Ribosom-Sec61p-Komplexes in der Membran von Proteoliposomen zeigte, daß auch der Abstand zwischen Ribosom und Membranoberfläche mindestens  $15\text{\AA}$  beträgt (Anlage 4; Abbildung 4). Die deutliche Trennung des Sec61p-Oligomers vom Ribosom ist daher kein Artefakt der Solubilisierung.

Der Mittelpunkt des Sec61p-Zylinders (bzw. die zentrale Pore) liegt in der Verlängerung eines durch die große ribosomale Untereinheit führenden Tunnels. Dieser Tunnel verbindet das aktive Zentrum im Inneren des Ribosoms mit dem Ort auf der Oberfläche des Ribosoms, an dem die naszierende Kette heraustritt (Bernabeu et al., 1983), und leitet vermutlich die naszierende Kette durch die große ribosomale Untereinheit. Die genaue Anordnung des Sec61p-Zylinders unter dem Austrittsort der naszierenden Kette impliziert, daß die Polypeptidkette direkt aus dem ribosomalen Tunnel durch die zentrale Pore des Sec61p-Oligomers in das ER geleitet werden kann.

## **2.2. Der dem Sec61p-Komplex verwandte heterotrimere Ssh1p-Komplex spielt eine Rolle beim cotranslationalen Proteintransport in das ER der Hefe**

Enno Hartmann entdeckte in der Hefe-Datenbank ein dem Sec61p verwandtes Molekül, das als Ssh1p (Sec-sixty one-homolog 1) bezeichnet wird, und ein homologes Protein des Sbh1p, das wir Sbh2p (Sec61p β homolog 2) nennen (Anlage 2; Abbildung 1). Das Ssh1p ist dem Sec61p strukturell ähnlich. Wie dieses besitzt es vermutlich zehn Membran-durchspannende Segmente, hat eine Molmasse von ~53 kD und ist ein sehr basisches Protein. Vergleicht man die zu ~30% identischen Aminosäuresequenzen von Ssh1p und Sec61p findet man die größten Ähnlichkeiten in ihren cytoplasmatischen Loop-Bereichen, was für einen gemeinsamen cytoplasmatischen Interaktionspartner spricht. Mit Immunofluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, daß Ssh1p im ER lokalisiert ist (Anlage 2; Abbildung 3). Die Aminosäuresequenzen der beiden Sbh-Proteine sind zu ungefähr 50% identisch. Sbh2p durchspannt mit einem hydrophoben Segment nahe dem C-Terminus wie Sbh1p die ER-Membran vermutlich einmal; der N-Terminus liegt im Cytoplasma (auch Toikkanen et al., 1996).

Wir untersuchten mit genetischen und biochemischen Methoden, ob die beiden neu-entdeckten Proteine Ssh1p und Sbh2p an der Translokation von Proteinen in das ER der Hefe beteiligt sind. Dabei wurde außerdem die Funktion der Sbh1p-Untereinheit des heterotrimeren Sec61p-Komplexes *in vivo* analysiert.

### ***Ssh1p, Sbh1p und Sbh2p sind für den Proteintransport von Bedeutung***

Das *SSH1* Gen kann im Gegensatz zu *SEC61* ohne Verlust der Überlebensfähigkeit deletiert werden (Anlage 2; Abbildung 4). Eine solche Hefemutante ist jedoch in ihrem Wachstum gegenüber dem Wildtyp leicht gehemmt. Dieser Wachstumsdefekt wird dramatisch verstärkt, wenn die Deletion des *SSH1*-Gens in einem Stamm vorgenommen wird, dessen *SEC61*-Gen

bereits mutiert ist (synthetischer Phänotyp mit dem temperatursensitiven *sec61-2* Allel; Anlage 2; Abbildung 5). Bei der gewählten Temperatur weist die *sec61-2* Mutante allein nur einen geringen Wachstumsphänotyp auf. Die beobachtete genetische Interaktion zwischen Sec61p und Ssh1p deutet darauf hin, daß beide Proteine zumindest teilweise überlappende Funktionen in der ER-Membran besitzen. Da gezeigt werden konnte, daß der Phänotyp der *sec61-2* Mutante durch den Abbau des mutierten Sec61p hervorgerufen wird (Biederer et al., 1996), könnte man annehmen, daß Ssh1p bei einer verringerten Sec61p-Konzentration für die Translokationsaktivität der Hefezelle essentiell wird. Bisher konnte allerdings kein Translokationsdefekt in Zellen nachgewiesen werden, die das Ssh1p nicht besitzen (nicht gezeigt und persönliche Mitteilung von B. Wilkinson).

Sbh1p und Sbh2p sind ebenfalls nicht essentiell; das Fehlen von Sbh1p oder Sbh2p hat keinen Effekt auf das Wachstum der Zellen bei allen getesteten Temperaturen. Die Deletion beider *SBH* Gene resultiert jedoch in einer starken Wachstumshemmung bei hohen Temperaturen und deutlichen Translokationsdefekten (Anlage 2; Abbildung 2). Einerseits akkumulieren *in vivo* unprozessierte Preproteine der beiden normalerweise ins ER transportierten Proteine Kar2p und Prepro-Alphafaktor im Cytosol dieser Mutante, andererseits ist *in vitro* die posttranslationale Transportaktivität isolierter Mikrosomen deutlich reduziert.

Im Falle der  $\Delta sbh1$ - und  $\Delta sbh2$ -Einzeldeletionsmutanten konnte *in vivo* keine Akkumulation der unprozessierten Form des co- und posttranslational transportierbaren Kar2p nachgewiesen werden. Der ausschließlich posttranslational transportierte Prepro-Alphafaktor wird jedoch in Zellen, denen nur Sbh1p, aber nicht in solchen, denen allein Sbh2p fehlt, leicht angereichert (Anlage 2, Abbildung 2). Die Tatsache, daß die gleichzeitige Deletion von *SBH1* und *SBH2* zu deutlichen Translokationsdefekten führt, zeigt, daß sowohl Sbh1p als auch Sbh2p zur Translokationskapazität der Zelle beitragen. Die fehlenden oder nur minimalen Translokations- oder Wachstumsdefekte der  $\Delta ssh1$ -,  $\Delta sbh2$ - und  $\Delta sbh1$ -Einzeldeletionsmutanten erklären wahrscheinlich, warum diese Proteine zuvor nicht in genetischen Screens nach Hefemutanten, die in der Sekretion von Proteinen gestört sind, identifiziert wurden.

Hefen, denen Ssh1p fehlt, enthalten im Vergleich zu Wildtypzellen deutlich weniger Sbh2p, was vermuten läßt, daß Sbh2p durch eine Interaktion mit Ssh1p stabilisiert wird (Anlage 2; Abbildung 4). Daraus ergab sich die Hypothese, daß Ssh1p und Sbh2p ebenso wie ihre Homologen Sec61p und Sbh1p Bestandteile eines Komplexes in der ER-Membran der Hefe sind.

***Ssh1p und Sbh2p sind Bestandteile eines heterotrimeren Komplexes***

Ein beträchtlicher Anteil des Ssh1p und Sbh2p der ER-Membran läßt sich mit Digitonin in Lösung bringen (ungefähr 80%; Anlage 2; Abbildung 8). Coimmunopräzipitationen im Digitoninextrakt deuteten darauf hin, daß Ssh1p und Sbh2p zusammen mit Sss1p einen eigenständigen Komplex bilden, der nicht mit den Untereinheiten des tetrameren Sec62/63p-Komplexes interagiert (Anlage 2; Abbildung 6A). Durch die biochemische Aufreinigung des Komplexes aus dem Digitoninextrakt konnte diese Annahme bestätigt und darüber hinaus gezeigt werden, daß neben Ssh1p, Sbh2p und Sss1p keine weiteren Proteine in dem sogenannten Ssh1p-Komplex enthalten sind (Anlage 2; Abbildungen 6B und C). Der heterotrimere Ssh1p-Komplex befindet sich wie der Sec61p-Komplex im Durchlauf einer Q-Sepharosesäule und kann mit ungefähr 500mM Kaliumacetat von SP-Sepharose eluiert werden.

Das kleine Protein Sss1p ist eine identische Untereinheit der beiden homologen heterotrimeren Komplexe der Hefe. Ssh1p oder Sbh2p bilden in Wildtyphefen und auch in den verschiedenen Deletionsmutanten keine heterologen Komplexe mit Sec61p oder Sbh1p. Die einzige Ausnahme besteht im Fall der  $\Delta ssh1/\Delta sbh1$ -Doppeldeletionsmutante, in der Sbh2p und Sec61p miteinander assoziiert sind (Anlage 2; Abbildungen 6 und 7).

Der Ssh1p-Komplex existiert nicht ausschließlich im Digitoninextrakt. Eine signifikante Menge ist aufgrund der Assoziation mit membrangebundenen Ribosomen auch in der RAMP-Fraktion zu finden und kann somit erst nach Entlassen der naszierenden Polypeptidketten von den Ribosomen in Lösung gebracht werden (ungefähr 20%; Anlage 2; Abbildung 8). Der Ssh1p-Komplex verhält sich demnach genauso wie der Sec61p-Komplex der Hefe und des Säugers. Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß der in Proteoliposomen integrierte Ssh1p-Komplex wie der Sec61p-Komplex spezifisch an gereinigte Ribosomen bindet (nicht gezeigte Ergebnisse). Da für den Säuger-Sec61p-Komplex im rekonstituierten System eine Funktion im cotranslationen Transportmodus demonstriert worden ist (Görlich und Rapoport, 1993), nehmen wir an, daß auch der Ssh1p-Komplex eine Rolle im cotranslationalen Transport von Proteinen spielt. Diese Sicht wird dadurch unterstützt, daß der Ssh1p-Komplex in Detergenzlösung oligomere Ringstrukturen bildet, die denen des Sec61p-Komplexes der Hefe gleichen (nicht gezeigte Ergebnisse).

Im Gegensatz zum Sec61p-Komplex interagiert der Ssh1p-Komplex nicht mit dem tetrameren Sec62/63p-Komplex, um einen stabilen heptameren Sec-Komplex zu formen (Anlage 2; Abbildungen 6). Da nur der heptamere Sec-Komplex, aber nicht einer seiner beiden Teilkomplexe



den posttranslationalen Transport von Proteinen vermitteln kann (Panzner et al., 1995), postulieren wir, daß der Ssh1p-Komplex keine Funktion im posttranslationalen Proteintransport besitzt. In Übereinstimmung damit akkumuliert der ausschließlich posttranslational transportierbare Prepro-Alphafaktor in Hefezellen, denen Sbh1p fehlt, jedoch nicht in solchen, die kein Sbh2p besitzen (siehe oben). Außerdem ist der allein oder auch zusammen mit dem Sec62/63p-Komplex in Proteoliposomen integrierte Ssh1p-Komplex in Gegenwart von Kar2p und ATP nicht in der Lage, den posttranslationalen Transport verschiedener Testsubstrate zu katalysieren (nicht gezeigte Ergebnisse).

### 2.3. Die Erkennung der Signalsequenz im posttranslationalen Transportmodus

Der posttranslationale Transport von Proteinen durch die Membran des ER der Hefe gliedert sich in zwei Phasen. Das Translokationssubstrat bindet zunächst in einer Kar2p- und ATP- unabhängigen Reaktion an die cytosolische Seite des Sec-Komplexes in der Membran. Anschließend sind Kar2p und ATP erforderlich, um den Precursor durch einen Kanal in das Lumen des ER zu transportieren (Lyman und Schekman, 1997; Matlack et al. 1997). Während des Bindungsschrittes wird die Signalsequenz des Translokationssubstrats durch den Sec-Komplex erkannt. Der Mechanismus der Signalsequenzerkennung ist nur wenig untersucht und weitgehend unverstanden. Vor allem ist unklar, welche Komponenten des Sec-Komplexes daran beteiligt sind. Das etablierte rekonstituierte System aus gereinigten Komponenten bietet optimale Voraussetzungen um dieser Frage nachzugehen. Fehlt Kar2p in den Proteoliposomen, stellt das an den Sec-Komplex gebundene Substrat ein stabiles Translokationsintermediat dar. Wir wählten einen Photoquervernetzungsansatz, um zu untersuchen, in welcher Umgebung sich die Signalsequenz nach der Bindung an den Sec-Komplex befindet (Anlage 3). Außerdem wurden die Interaktionen des reifen Teils des gebundenen Prepro-Alphafaktors analysiert.

#### **Experimentelle Herangehensweise**

Als ein posttranslational transloziertes Preprotein verwendeten wir in diesen Experimenten den Prepro-Alphafaktor (Panzner et al., 1995). Die Translation der mRNA des Prepro-Alphafaktors wird *in vitro* in Gegenwart von <sup>35</sup>S-Methionin im Retikulozytenlysat durchgeführt. Um einen cotranslationalen Transport auszuschließen, wird die Synthese mit Cycloheximid gestoppt und alle Ribosomen werden durch Sedimentation entfernt. Anschließend wird der radioaktiv markierte Prepro-Alphafaktor mit Proteoliposomen, die den Sec-Komplex enthalten, inkubiert. Dabei bindet der Precursor effektiv an den Sec-Komplex, wird aber nicht in das Innere der Vesikel transportiert, da den Proteoliposomen Kar2p fehlt. Zur Untersuchung des Bindungsschrittes können anstelle rekonstituierter Proteoliposomen auch Mikrosomen des ER der Hefe verwendet werden. Da diese Kar2p enthalten, muß jedoch ATP im Bindungsansatz depletiert werden, um eine Translokation zu verhindern.

Um herauszufinden, in welcher Umgebung sich der Prepro-Alphafaktor nach der Bindung an den Sec-Komplex befindet, wurde ein Photoquervernetzungsansatz gewählt. Dieser Ansatz beruht darauf, daß während der Synthese am Ribosom chemische Gruppen mittels modifizierter Aminoacyl-tRNAs in die Polypeptidkette eingebaut werden können (Johnson et al., 1976). Da modifizierte Aminoacyl-tRNAs zwar von Ribosomen, modifizierte Aminosäuren aber nicht von den hochspezifischen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen akzeptiert werden, dürfen die Aminosäuren erst nach ihrer Übertragung auf die tRNA chemisch verändert werden. So können modifizierte Lysine, die in ihrer Seitenkette eine photoaktivierbare Quervernetzungsgruppe tragen, an Stelle von nativen Lysinen in den Prepro-Alphafaktor eingebaut werden, wenn dessen Synthese *in vitro* in Gegenwart einer modifizierten Lysyl-tRNA und in Abwesenheit von Lysin durchgeführt wird (Krieg et al., 1996; Kurzchalia et al., 1986). Als photoreaktive Gruppe verwendeten wir die Trifluoromethyl-diazirino-Benzoesäure (Brunner et al., 1980; Wiedmann et al., 1987). Das Reagenz kann mittels eines N-Hydroxy-Succinimidoesters auf die  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins der Lysyl-tRNA übertragen werden. Wird die Probe, d.h. der Prepro-Alphafaktor nach seiner Bindung an den Sec-Komplex in Membranen, mit langwelligem UV-Licht bestrahlt, entsteht aus dem Diazirino-Baustein ein sehr reaktives Carben, das kovalente Bindungen zu allen Molekülen in unmittelbarer Nähe ausbildet, egal, ob es sich dabei um Proteine, Lipide oder Wassermoleküle handelt. Mit dieser Methode ist es möglich, die Umgebung der nativen Lysine des zu untersuchenden Proteins zu charakterisieren. Eine Ortsspezifität der Quervernetzung kann erreicht werden, indem alle nativen Lysine des Proteins durch zielgerichtete *in vitro* Mutagenese der DNA entfernt und einzelne Lysine an den gewünschten Positionen der Polypeptidkette einbaut werden.

Die entstandenen Quervernetzungsprodukte zeichnen sich aufgrund ihres größeren Molekulargewichts durch eine veränderte Beweglichkeit in SDS-Polyacrylamidgelen aus. Die quervernetzten Interaktionspartner des an den Sec-Komplex gebundenen Precursors können durch Immunopräzipitationen mit Antikörpern gegen die verschiedenen Sec-Proteine unter denaturierenden Bedingungen identifiziert werden. Quervernetzungsprodukte mit Lipidmolekülen sind durch ihre Spaltbarkeit mit Phospholipase A2 nachweisbar (Martoglio et al., 1995). Alle Quervernetzungsprodukte des gebundenen Prepro-Alphafaktors können auch einfacherweise auf einmal mit dem intakten Sec-Komplex in Digitonin coimmunopräzipitiert werden. Die Membranen werden dazu im Anschluß an die Bindungsreaktion und Bestrahlung mit UV-Licht mit Digitonin solubilisiert und der in diesem Detergenz stabile Sec-Komplex mit Antikörpern gegen Sec62p immunopräzipitiert. Unter den gewählten Bedingungen bleibt der gebundene Prepro-Alphafaktor, unabhängig davon, ob er quervernetzt ist oder nicht, fest mit dem Sec-Komplex assoziiert (Matlack et al., 1997). Zur quantitativen Auswertung wurde die Intensität der Quervernetzungsprodukte auf die an den Sec-Komplex gebundene Menge der entsprechenden Lysyl-Mutante des Prepro-Alphafaktors bezogen.

Der reaktive Diazirino-Baustein der Trifluoromethyl-diazirino-Benzoesäure kann auch direkt in den aromatischen Ring eines Phenylalanins eingebaut werden und das modifizierte Phenylalanin (Trifluoromethyl-Diazirino-Phenylalanin) ortsspezifisch mittels der Suppressor-tRNA-Methode in die

Polypeptidkette integriert werden (High et al., 1993). Dazu werden einzelne Stopcodons in die DNA eingeführt und diese während der Translation *in vitro* durch Suppressor-tRNAs, die das modifizierte Phenylalanin tragen, suppressiert. Der Diazirino-Baustein ist in dem in die Polypeptidkette eingebauten Phenylalanyl-Derivat 6Å von der Peptidbindung entfernt, dem gegenüber beträgt dieser Abstand beim Lysyl-Derivat 13Å. Die Einführung der modifizierten Aminosäuren hat keinen Einfluß auf die Translation, Bindung oder Translokation des Prepro-Alpha faktors.

### ***Signalsequenz-abhängige Interaktionen des Prepro-Alpha faktors mit dem Sec-Komplex***

Erste Untersuchungen mit dem photoreaktiven Lysyl-Derivat zeigten, daß sich die Position 5 der Signalsequenz des an den Sec-Komplex gebundenen Prepro-Alpha faktors in Nachbarschaft zu Sec61p befindet, wohingegen die C-terminale Hälfte des Precursors Sec62p, Sec71p und Sec72p kontaktiert (Anlage 3; Abbildung 1). Um zu überprüfen, ob diese Quervernetzungen die Umgebung von Translokationsintermediaten widerspiegeln, wurde das Verhalten entsprechender Prepro-Alpha faktor-Mutanten mit defekten Signalsequenzen, deren Bindungs- und Transporteffizienz stark reduziert ist, untersucht (Anlage 3; Abbildung 1 und nicht gezeigte Daten). Da die verwendeten Signalsequenzmutanten auch in ihrem Quervernetzungsvermögen zu den Proteinen des Sec-Komplexes deutlich gestört sind, kann man annehmen, daß das beobachtete Quervernetzungsmuster spezifisch für Proteine mit funktionellen Signalsequenzen ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß sich der gebundene Prepro-Alpha faktor in einem translokationskompetenten Zustand befindet. Nach Zugabe von Kar2p und ATP wird er durch den Kanal transportiert und auf der luminalen Seite des Sec-Komplexes freigesetzt (Matlack et al., 1997). Die Intensität der Quervernetzungsprodukte des Prepro-Alpha faktors zu den Sec-Proteinen nimmt dabei dramatisch ab (nicht gezeigte Ergebnisse).

Die beschriebene Quervernetzung des Prepro-Alpha faktors zu den Sec-Proteinen erfordert außerdem die Assoziation der beiden Teilkomplexe des Sec-Komplexes. Sowohl für den Sec61p- als auch für den Sec62/63p-Komplex allein sind keine Verknüpfungen mit dem Precursor nachweisbar (Anlage 3; Abbildung 2). In Übereinstimmung damit sind beide Teilkomplexe ebenfalls nicht in der Lage, Preproteine zu transportieren oder zu binden (Panzner et al., 1995; Matlack et al., 1997). Die Erkennung der Signalsequenz ist offensichtlich die Voraussetzung für die Bindung des Prepro-Alpha faktors an den Sec-Komplex.

### ***Die Signalsequenz-Bindungsstelle befindet sich an der Grenzfläche des Translokationskanals und der Lipiddoppelschicht***

Um die Umgebung der Signalsequenz des an den Sec-Komplex gebundenen Prepro-Alpha faktors im Detail zu analysieren, wurde das Lysyl-Reagenz an 15 verschiedenen Positionen der Signalsequenz des

Prepro-Alphafaktors eingebaut (Pos. 8-22). Die systematische Studie zeigte, daß die Signalsequenz nicht nur Sec61p sondern auch Sec62p und Sec71p kontaktiert (Anlage 3; Abbildung 3).

Das Ausmaß der Quervernetzung zu Sec61p, Sec71p und Sec62p ist an den einzelnen Positionen der Signalsequenz sehr verschieden. Effiziente Sec62p- und Sec71p-Quervernetzungsprodukte treten an den gleichen, durch 4 oder 5 Aminosäuren voneinander getrennten Positionen auf. Die Sec61p-Quervernetzungsprodukte können interessanterweise in zwei Klassen unterteilt werden, die sich in ihrer Mobilität im SDS-Polyacrylamidgel unterscheiden. Beide verhalten sich innerhalb des hydrophoben Bereichs der Signalsequenz sehr unterschiedlich. Hier sind besonders starke Vernetzungsprodukte der einen Klasse an solchen Positionen beobachtbar, an denen die der anderen Klasse kaum nachweisbar sind. Auffällig ist dabei wiederum eine Periodizität von 4 bis 5 Aminosäuren.

Das mit dem Lysyl-Derivat erhaltene, strikt periodische Vernetzungsmuster innerhalb des hydrophoben Bereichs der Signalsequenz, das nicht nur mit Proteoliposomen sondern auch mit rauhen Mikrosomen beobachtet wurde, spricht für eine spezifische Bindungsstelle der Signalsequenz, die von den Proteinen Sec61p, Sec62p und Sec71p gebildet wird. Das periodische Auftreten der verschiedenen Quervernetzungsprodukte deutet außerdem darauf hin, daß der hydrophobe Teil der gebundenen Signalsequenz eine helikale Struktur einnimmt (Anlage 3; Abbildung 7A). Positionen, die effizient zu Sec62p und Sec71p vernetzt werden können, befinden sich auf einer Seite der Signalsequenzhelix; Positionen, an denen die beiden Sec61p-Quervernetzungsprodukte auftreten, liegen auf jeweils gegenüberliegenden Seiten dieser Helix. Erklärt man die unterschiedliche Mobilität der beiden Sec61p-Quervernetzungsprodukte durch eine Vernetzung der Signalsequenz zu zwei verschiedenen Regionen des Sec61p, ergibt sich die Hypothese, daß die Signalsequenz auf gegenüberliegenden Seiten von unterschiedlichen Regionen des Sec61p kontaktiert wird.

Der Prepro-Alphafaktor wurde nicht nur zu Proteinen, sondern auch zu Lipidmolekülen vernetzt. Quervernetzungsprodukte des Prepro-Alphafaktors zu Lipiden traten an allen Positionen der Signalsequenz auf. Sie konnten quantitativ mit dem Sec-Komplex coimmunopräzipitiert werden und sind daher nicht Prepro-Alphafaktor-Molekülen zuzuordnen, die vollständig in die Lipidschicht entlassen worden sind. Da jede Position der Signalsequenz neben Proteinen auch Lipide kontaktiert, muß sich die Bindungsstelle der Signalsequenz an der Grenzfläche zwischen Proteinen und der Lipiddoppelschicht befinden.

### ***Die Signalsequenz wird hauptsächlich von Sec61p erkannt***

Da das photoreaktive Reagenz des Lysyl-Derivats aufgrund der langen Seitenkette sehr beweglich ist, untersuchten wir die Umgebung der Signalsequenz des an den Sec-Komplex gebundenen Prepro-

Alphafaktors (Pos. 8-19) auch mit dem kürzeren und weniger flexiblen Phenylalanyl-Derivat (Anlage 3; Abbildung 4).

Die Analyse mit dem Phenylalanyl-Derivat zeigte, daß der hydrophobe Teil der gebundenen Signalsequenz hauptsächlich von Sec61p erkannt wird. Während sich erneut alle Positionen der Signalsequenz in der Nähe von Sec61p und auch in der Nähe von Lipiden befanden, konnten Sec62p und Sec71p nur am C-terminalen Ende der Signalsequenz nachgewiesen werden. Die beiden Proteine des Sec62/63p-Teilkomplexes sind vermutlich weiter vom hydrophoben Teil der Signalsequenz entfernt als Sec61p, und können daher nicht von dem kurzen Photoreagenz erreicht werden. Wie mit dem Lysyl-Derivat konnten auch mit dem Phenylalanyl-Derivat zwei charakteristische Sec61p-Quervernetzungsprodukte unterschiedlicher Mobilität im SDS-Polyacrylamidgel beobachtet werden. Das periodische Auftreten der beiden Sec61p-Quervernetzungsklassen scheint hier noch betonter. Die Positionen, an denen die stärksten Sec61p-Quervernetzungsprodukte beider Klassen nachweisbar sind, sind gegenüber dem Lysyl-Derivat um genau eine Aminosäure verschoben. Sie befinden sich allerdings wiederum an gegenüberliegenden Seiten der postulierten Signalsequenzhelix.

Wir verwendeten einen mutanten, aber translokationsaktiven Sec-Komplex, dem Sec71p und Sec72p fehlen, um Hinweise auf die Bedeutung des Sec71p für die Signalsequenzerkennung zu erhalten. Experimente, in denen die Umgebung der Signalsequenz des Prepro-Alphafaktors nach der Bindung an diesen Sec-Komplex mit dem Lysyl-Derivat untersucht wurde, zeigten, daß das Sec61p-Quervernetzungsmuster verglichen zum Wildtyp-Sec-Komplex unverändert ist. Sec71p spielt demnach keine entscheidende Rolle bei der Bindung der Signalsequenz des Prepro-Alphafaktors.

Mit beiden in dieser Arbeit verwendeten photoreaktiven Derivaten konnte keine Nachbarschaft der Signalsequenz zu Sec72p, Sec63p, Sss1p oder Sbh1p nachgewiesen werden. Diese Proteine sind daher wahrscheinlich nicht an der Erkennung von Signalsequenzen beteiligt.

### ***Die Transmembrandomänen 2 und 7 des Sec61p flankieren die Signalsequenz auf gegenüberliegenden Seiten***

Um herauszufinden, welche Regionen des Sec61p mit der Signalsequenz des Prepro-Alphafaktors interagieren, verwendeten wir in den Quervernetzungsexperimenten verschiedene Sec61p-Mutanten, die jeweils in einem ihrer cytoplasmatischen oder luminalen Loop-Abschnitte eine Schnittstelle für die Protease Faktor Xa enthalten (Wilkinson et al., 1996). Damit ist es möglich, die Sec61p-Quervernetzungsprodukte des an den Sec-Komplex gebundenen Prepro-Alphafaktors spezifisch mit der Protease Xa zu spalten, und den Ort der Vernetzung einem der beiden entstandenen Fragmente des Sec61p zuzuordnen. Die beiden Fragmente des Sec61p können entweder durch Immunopräzipitationen mit Antikörpern gegen den N- oder C-Terminus des Sec61p oder aufgrund ihrer Größe unterschieden

werden. Durch den Einsatz verschiedener Sec61p-Xa-Mutanten kann eine zwischen zwei Faktor Xa-Schnittstellen aufeinanderfolgender Loop-Abschnitte liegende Region des Sec61p identifiziert werden, die zu einer bestimmten Position des Prepro-Alphafaktors vernetzt wurde.

Die mit dem Phenylalanyl-Derivat durchgeführte Analyse zeigte, daß alle Positionen des hydrophoben Teils der Signalsequenz des Prepro-Alphafaktors hauptsächlich entweder zur Transmembrandomäne 2 oder zur Transmembrandomäne 7 des Sec61p bzw. zu den an diese Transmembrandomänen angrenzenden Loop-Abschnitten des Sec61p vernetzt werden können (Anlage 3; Abbildung 5). Die Vernetzbarkeit zu diesen beiden Regionen des Sec61p korreliert gut mit dem Auftreten der beiden Sec61p-Quervernetzungsprodukte im SDS-Gel, deren unterschiedliche Mobilität also tatsächlich auf einer Vernetzung der Signalsequenz zu verschiedenen Regionen des Sec61p beruht. In Übereinstimmung damit liegen Positionen, an denen starke Vernetzungsprodukte zu Transmembrandomäne 2 bzw. den angrenzenden Loop-Abschnitten auftreten, auf einer Seite der Signalsequenzhelix, solche an denen effiziente Vernetzungen zu Transmembrandomäne 7 oder den angrenzenden Loop-Abschnitten beobachtbar sind, auf der gegenüberliegenden Seite dieser Helix (Anlage 3; Abbildung 7B). Innerhalb des hydrophoben Teils der Signalsequenz konnten an einigen Positionen, die sich in der Nähe der Transmembrandomäne 2 befinden, zusätzlich signifikante Quervernetzungen zu der die Transmembrandomäne 1 einschließenden Region des Sec61p nachgewiesen werden. Im SDS-Gel verhalten sich die Quervernetzungsprodukte dieser beiden Regionen identisch (Anlage 3; Abbildung 5).

Obwohl experimentell nicht zwischen einer Vernetzung zu den Transmembran- oder Loop-Bereichen des Sec61p unterschieden werden konnte, nehmen wir an, daß die Signalsequenz des Prepro-Alphafaktors von den Transmembrandomänen 2 und 7 des Sec61p und nicht von den angrenzenden Loop-Abschnitten erkannt wird. Die Signalsequenz durchspannt vermutlich die Membran, da zwei bis drei Windungen der an der Grenzfläche zur Lipidschicht gebundenen Signalsequenzhelix mit den gleichen Regionen des Sec61p interagieren.

Wie mit dem Phenylalanyl-Derivat konnten mit dem Lysyl-Derivat vor allem die Transmembran-domänen 2 und 7 in der Umgebung des hydrophoben Teils der Signalsequenz des Prepro-Alphafaktors nachgewiesen werden (Anlage 3; Abbildung 6). Die Positionen der Signalsequenz, die diese beiden Regionen des Sec61p besonders stark kontaktieren befinden sich wiederum jeweils auf gegenüberliegenden Seiten der Signalsequenzhelix, sind aber, wie bereits durch die Mobilität der Sec61p-Quervernetzungsprodukte angedeutet wurde (siehe oben), um eine Aminosäure im Vergleich zum Phenylalanyl-Derivat verschoben (Anlage 3; Abbildung 7A).

Die Einführung verschiedener Derivate führt offensichtlich dazu, daß die Signalsequenz innerhalb der gleichen Bindungsstelle etwas anders orientiert ist. Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß Signalsequenzen zwar in einer spezifischen Art und Weise von zwei definierten Regionen des Sec61p

(Transmembrandomänen 2 und 7) gebunden werden, ihre exakte Orientierung relativ zu diesen Regionen des Sec61p jedoch durch ihre Aminosäurezusammensetzung bestimmt wird. Das könnte widerspiegeln, wie Sec61p in der Lage ist, viele verschiedene, in ihrer Länge und Zusammensetzung variable Signalsequenzen zu binden.

***Der unmittelbar der Signalsequenz folgende Bereich der Polypeptidkette kontaktiert hauptsächlich die Transmembrandomäne 8 von Sec61p***

Um herauszufinden, in welcher Umgebung sich der unmittelbar der Signalsequenz folgende Abschnitt des an den Sec-Komplex gebundenen Prepro-Alpha-faktors befindet, bauten wir einzelne photoreaktive Lysyl-Derivate an den Positionen 23 bis 29 der Polypeptidkette ein. Während Quervernetzungsprodukte zu Sec62p und Sec71p nur an Position 24 beobachtet werden konnten, treten effiziente Sec61p-Quervernetzungsprodukte unterschiedlicher Mobilität im SDS-Gel an allen sieben Positionen auf (Anlage 3; Abbildung 3). Die Intensität der Sec61p-Quervernetzungsprodukte unterscheidet sich zwischen den einzelnen Positionen kaum. Der unmittelbar der Signalsequenz folgende Abschnitt des Prepro-Alpha-faktors ist offensichtlich im Gegensatz zur Signalsequenz nicht in einer definierten Orientierung an den Sec-Komplex gebunden und relativ frei beweglich. Eine Analyse mit den Sec61p-Xa-Mutanten zeigte, daß die Positionen 25 bis 29 des Prepro-Alpha-faktors hauptsächlich die Transmembrandomäne 8 des Sec61p kontaktieren (Anlage 3; Abbildung 6 und nicht gezeigte Daten). Quervernetzungsprodukte zu Lipiden konnten außerhalb der Signalsequenz nicht nachgewiesen werden (Anlage 3; Abbildung 3). Der unmittelbar der Signalsequenz folgende Abschnitt der Polypeptidkette befindet sich offensichtlich in einer ganz anderen Umgebung als die Signalsequenz.

**2.4. Die cytosolischen Interaktionspartner des Prepro-Alpha-faktors werden bei seiner Bindung an den Sec-Komplex freigesetzt**

Der Photoquervernetzungsansatz kann auch zur Untersuchung der Interaktionen des Prepro-Alpha-faktors im Cytosol eingesetzt werden, indem der Prepro-Alpha-faktor direkt nach seiner Synthese und der Entfernung der Ribosomen mit UV-Licht bestrahlt wird.

Der Prepro-Alpha-faktor wird nach seiner vollständigen Synthese im Retikulozytenlysat mit dem photoreaktiven Lysyl-Derivat zu einer Vielzahl von cytosolischen Proteinen vernetzt (Anlage 5; Abbildung 1). Hsp 70 und Tcp1 $\alpha$ , eine Untereinheit des TRiC-Komplexes (für  $\bar{t}$ -complex polypeptide 1 (Tcp1) ring complex), wurden bisher als cytosolische Interaktionspartner des Prepro-Alpha-faktors identifiziert (Anlage 5; Abbildungen 2A). Sie konnten sowohl in der Nähe der Signalsequenz als auch in der Nähe der C-terminalen Hälfte des Prepro-Alpha-faktors nachgewiesen werden. Aus dem Quervernetzungsmuster der einzelnen Positionen des Prepro-Alpha-faktors läßt sich nicht ableiten, ob es cytosolische Proteine gibt, die sich ausschließlich in der Nachbarschaft der Signalsequenz befinden.

Der Prepro-Alpha-faktor liegt im Retikulozytenlysat in verschiedenen Komplexen vor, die im Saccharosegradienten voneinander getrennt werden können (Anlage 5; Abbildung 2B). Jedem dieser Komplexe können bestimmte Quervernetzungspartner zugeordnet werden. Das Tcp1 $\alpha$ -



Quervernetzungsprodukt ist im Gegensatz zum Hsp70-Quervernetzungsprodukt in einem Komplex mit einem Molekulargewicht von ungefähr 700kD enthalten. Da dieses Molekulargewicht annähernd dem des TRiC-Komplexes entspricht, ist der Prepro-Alphafaktor vermutlich ein Substrat dieses hetero-oligomeren Chaperonkomplexes. Trotz der unterschiedlichen Zusammensetzung der Komplexe sind alle Populationen des Prepro-Alphafaktors translokationskompetent (Anlage 4; Abbildung 2C).

Der Prepro-Alphafaktor wird offensichtlich im Verlauf der Bindung an den Sec-Komplex von seinen cytosolischen Interaktionspartnern freigesetzt. Einerseits befindet sich der an den Sec-Komplex gebundene Prepro-Alphafaktor nicht mehr in der Nachbarschaft cytosolischer Proteine (Anlage 3; Abbildung 3), andererseits nimmt die Intensität der cytosolischen Quervernetzungs-produkte des Prepro-Alphafaktors deutlich ab, wenn dieser vor der Bestrahlung mit UV-Licht mit Proteoliposomen inkubiert wird, die den Sec-Komplex enthalten (Anlage 5; Abbildung 3). Die Beobachtung, daß neben anderen sowohl die Hsp70- als auch die Tcp1 $\alpha$ - Quervernetzungs-produkte des Prepro-Alphafaktors im Bindungsschritt verschwinden, ist in Übereinstimmung damit, daß der in verschiedenen cytosolischen Komplexen enthaltene Prepro-Alphafaktor gebunden bzw. transportiert werden kann.

Eine stabile Interaktion der Signalsequenz des Prepro-Alphafaktors mit cytosolischen Proteinen verhindert offensichtlich die posttranslationale Bindung des Prepro-Alphafaktors an den Sec-Komplex. Experimente, in denen der Prepro-Alphafaktor vor seiner Bindung an den Sec-Komplex zu cytosolischen Proteinen vernetzt wurde, zeigten, daß die cytosolischen Quervernetzungs-produkte der Signalsequenz des Prepro-Alphafaktors nicht an den Sec-Komplex binden (nicht gezeigte Ergebnisse). Anscheinend müssen die mit der Signalsequenz interagierenden cytosolischen Proteine freigesetzt werden, bevor die Signalsequenz vom Sec-Komplex in der Membran erkannt und der Prepro-Alphafaktor gebunden werden kann. Durch eine Quervernetzung wird dies verhindert.

### 3. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde der Transport von sekretorischen Proteinen in das ER der Hefe untersucht und dabei insbesondere die Frage beantwortet, wie die Signalsequenz des Prepro-Alphafaktors im ersten Schritt des posttranslationalen Transportprozesses erkannt wird.

#### 3.1. Der posttranslationale Transport in das ER der Hefe

##### ***Die Interaktionen des Translokationssubstrats Prepro-Alphafaktor im Cytosol, vor seiner posttranslationalen Translokation in das ER***

Der Prepro-Alphafaktor interagiert während seiner Synthese im Retikulozytenlysat, d.h. solange er ribosomenassoziiert ist, mit dem cotranslationalen Signalsequenzrezeptor SRP54 und dem ribosomenassoziierten Protein NAC (für "nascent polypeptide associated complex"; nicht gezeigte Daten). Diese Proteine sind nach der Termination der Translation durch eine Vielzahl anderer cytosolischer Proteine ersetzt. Zwei der cytosolischen Interaktionspartner des vollständig synthetisierten Prepro-Alphafaktors konnten als der TRiC-Komplex und Hsp70 identifiziert werden. Diese beiden Chaperone sind Bestandteil größerer cytosolischer Komplexe des Prepro-Alphafaktors, kommen aber nicht in den gleichen Komplexen vor. Die cytosolischen Komplexe verschiedener Zusammensetzung, in denen der Prepro-Alphafaktor vorliegt, weisen keine Unterschiede in der Translokationskompetenz auf. Diese Tatsache, und das Ergebnis, daß der TRiC-Komplex und Hsp70 sowohl zur Signalsequenz als auch zum reifen Teil des Prepro-Alphafaktors quervernetzt werden können, deuten darauf hin, daß beide Chaperone keine translokationsspezifische Funktion beim posttranslationalen Targeting übernehmen, sondern den Prepro-Alphafaktor lediglich in einer entfalteten und somit translokationskompetenten Konformation halten. In Übereinstimmung damit wurde gezeigt, daß Hsp70 den posttranslationalen Transport von Proteinen in das ER und die Mitochondrien der Hefe, d.h. in zwei verschiedene Organellen, stimuliert (Deshaies et al., 1988). Es ist offen, ob es cytosolische Proteine gibt, die spezifisch die Signalsequenz eines posttranslationalen Substrats erkennen oder ausschließlich an dem posttranslationalen Targeting zur Membran des Endoplasmatischen Retikulum beteiligt sind. Offensichtlich tritt keines der erhaltenen cytosolischen Quervernetzungsprodukte nur zur Signalsequenz des vollständig synthetisierten Prepro-Alphafaktors auf.

### ***Die Bindung des Prepro-Alphafaktors an den Sec-Komplex***

Die cytosolischen Interaktionspartner des Prepro-Alphafaktors werden bei seiner Bindung an den Sec-Komplex, dem ersten Schritt des posttranslationalen Transports in das ER der Hefe, vollständig freigesetzt. Obwohl die beiden Chaperone Hsp70 und TRiC-Komplex ATPasen sind und ihre Assoziation mit Proteinen durch den ATPase-Zyklus reguliert wird, ist ATP nicht für ihre Ablösung vom Prepro-Alphafaktor notwendig (nicht gezeigte Ergebnisse). In welcher Weise die Freisetzung der verschiedenen cytosolischen Interaktionspartner geschieht, ist nicht verstanden. Es ist einerseits vorstellbar, daß die Komplexe, in denen der Prepro-Alphafaktor vorliegt, nur transient sind und bereits im Cytosol ständig assoziieren und dissoziieren. Andererseits könnten die cytosolischen Proteine aktiv durch den Sec-Komplex abgelöst werden. In diesem Fall ist die Annahme naheliegend, daß der Sec-Komplex mit cytosolischen Partnern des Prepro-Alphafaktors interagieren kann, woraufhin die cytosolischen Komplexe zerfallen und der Prepro-Alphafaktor auf den Sec-Komplex übertragen wird.

Damit im ersten Schritt des posttranslationalen Transports durch die ER-Membran die Bindung des Prepro-Alphafaktors an den Sec-Komplex in der Membran erfolgt, muß die Polypeptidkette eine funktionelle Signalsequenz besitzen. Für die Erkennung der Signalsequenz sind beide Teilkomplexe des Sec-Komplexes, d.h. der Sec61p- und der Sec62/63p-Komplex, die nur miteinander oligomere Strukturen in Membranen bilden können (siehe Abschnitt 3.3.), notwendig.

### ***Die Erkennung der Signalsequenz innerhalb der Membran - ein proteinvermittelter Prozeß***

Die Bindungsstelle der Signalsequenz befindet sich an der Grenzfläche des Translokationskanals und der Lipiddoppelschicht, da alle Positionen der Signalsequenz des an den Sec-Komplex gebundenen Prepro-Alphafaktors zu Lipiden und zu Proteinen vernetzt werden können. Wenn man annimmt, daß der hydrophobe Bereich der Signalsequenz eine helikale Struktur bildet, wird die Signalsequenz auf gegenüberliegenden Seiten von den Transmembrandomänen 2 und 7 des Sec61p umgeben. Sec62p und Sec71p, die gemeinsam eine Seite der Signalsequenzhelix flankieren, könnten, obwohl sie sich in größerer Entfernung zur Signalsequenz als Sec61p befinden, ebenfalls an der Bindung der Signalsequenz beteiligt sein (siehe unten).

Die Existenz einer Signalsequenzbindungsstelle in der Membran, die in spezifischer Weise von Sec61p und Sec62/71p gebildet wird, deutet darauf hin, daß Signalsequenzen in der Membran hauptsächlich durch Protein-Protein-Wechselwirkungen erkannt werden. Unterstützt wird diese Sicht dadurch, daß synthetische Signalpeptide die Interaktion des Prepro-Alphafaktors mit dem Sec-Komplex in der Membran verhindern (nicht gezeigte Ergebnisse). Die Zahl der Signalsequenzbindungsstellen in der Membran ist demnach begrenzt. Für einen protein-vermittelten Prozeß spricht außerdem, daß der Prepro-Alphafaktor auch nach der Solubilisierung der Membran und intensiven Waschschritten mit Detergenz am Sec-

Komplex gebunden bleibt (Anlage 3 und Matlack et al., 1997). Dieses Ergebnis schließt eine essentielle Funktion von Lipiden bei der Aufrechterhaltung der Interaktionen des Prepro-Alphafaktors mit dem Sec-Komplex aus. Lipide, aber nicht die Lipiddoppelschicht, sind jedoch für die vorherige Erkennung der Signalsequenz und die damit einhergehende Bindung des Prepro-Alphafaktors an den Sec-Komplex absolut notwendig, denn dieser Prozeß kann nur dann in Detergenzlösung nachvollzogen werden, wenn zusätzlich zum Sec-Komplex große Lipidmengen anwesend sind (Matlack et al., 1997). Welche Rolle die Lipidmoleküle im Bindungsschritt spielen, ist unklar. Sie könnten einfach eine zusätzliche Verteilungsphase für Signalsequenzen bilden und die helikale Struktur der Signalsequenz begünstigen oder die Konformation des Sec-Komplexes beeinflussen, möglicherweise eine aktive Konformation stabilisieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen keine Aussage darüber zu, wie Signalsequenzen ihre Bindungsstelle am Translokationskanal erreichen. Es ist möglich, daß sie direkt senkrecht zur Membran in den Kanal inserieren, oder, daß sie erst in die Lipidschicht eindringen und dann seitlich zum Kanal gelangen. Im letzteren Fall könnte die Fähigkeit künstlicher Lipiddoppelschichten, funktionelle von nicht-funktionellen Signalpeptiden zu unterscheiden (Briggs et al., 1985), von direkter Bedeutung für den Translokationsprozeß sein.

### ***Die Insertion der Polypeptidkette in den Kanal und der anschließende Transport durch die Membran***

Die Quervernetzungsexperimente dieser Arbeit zeigen, daß sich auch der unmittelbar der Signalsequenz folgende Bereich des Prepro-Alphafaktors nach der Bindung an den Sec-Komplex in der Nähe des Sec61p befindet. Dieser Abschnitt der Polypeptidkette wird im Gegensatz zur Signalsequenz hauptsächlich von der Transmembrandomäne 8 des Sec61p kontaktiert. Eine Interaktion mit Lipiden konnte nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen sich in Übereinstimmung mit Daten aus dem cotranslationalen Säugersystem (Shaw et al., 1988; Mothes et al., 1994; Martoglio et al., 1995) am besten durch ein Modell erklären, in dem die Polypeptidkette im Prozeß der Bindung als eine Haarnadelstruktur in den Translokationskanal inseriert. Ein Teil der Schleife ist fixiert und wird von der Signalsequenz gebildet. Diese ist so in einer Transmembrankonformation gebunden, daß sich ihr N-Terminus am cytosolischen Ende und ihr C-Terminus am luminalen Ende des Kanals befindet. Der andere Teil der Haarnadelschleife besteht aus dem der Signalsequenz folgenden Bereich der Polypeptidkette. Dieser Bereich des Prepro-Alphafaktors ist im Gegensatz zur Signalsequenz nicht in einer definierten Orientierung im Translokationskanal gebunden und vermutlich relativ frei beweglich, da sich das Sec61p-Quervernetzungsmuster der einzelnen Positionen kaum unterscheidet. Dieser Abschnitt befindet sich immer in einer hydrophilen Umgebung und ist Lipiden unzugänglich.

Im zweiten Schritt des posttranslationalen Transportprozesses wird der C-terminale Teil der Polypeptidkette in einer Kar2p- und ATP- abhängigen Weise durch eine Umgebung in der ER-Membran transportiert, die ausschließlich durch Sec61p gebildet wird und vollständig von der Lipidschicht abgeschildert ist (nicht gezeigte Daten). Dies konnte in Quervernetzungsexperimenten bestimmt werden, da es möglich ist, den vollständigen Transport eines Proteins durch eine große Gruppe an seinem C-Terminus zu blockieren (zum Beispiel eine tRNA), wodurch die Umgebung der C-terminalen Hälfte des Prepro-Alpha-faktors in der Membran mit dem Photoquervernetzungs-ansatz untersucht werden kann. Welche Transmembrandomänen des Sec61p den Kanal auskleiden, durch den die hydrophile Kette in das ER gelangt, konnte unter Verwendung der Sec61p-Xa-Mutanten bisher nicht eindeutig geklärt werden. Klar ist jedoch, daß Transmembran-domänen des Sec61p, die nicht an der Erkennung der Signalsequenz beteiligt sind, eine entscheidende Rolle spielen, und daß die Kette im Kanal nicht definiert gebunden ist (nicht gezeigte Ergebnisse).

Während des Kar2p-abhängigen Translokationsprozeß entsteht das reife Protein, indem die Signalsequenz auf der luminalen Seite der ER-Membran abgespalten wird (von Heijne, 1998). Über den Verbleib der abgespaltenen Signalsequenz beim posttranslationalen Transport gibt es keine Informationen. In einem synchronisierten cotranslationen Transportsystem konnte allerdings gezeigt werden, daß sich Signalpeptide kurz nach ihrer Abspaltung in der Umgebung von Lipiden und der Signalpeptidase befinden, und anschließend weiter prozessiert werden, wodurch ihre Akkumulation in der Membran verhindert wird (Lyko et al., 1995; Martoglio et al., 1997).

### **3.2. Die Signalsequenzerkennung durch Sec61p ist evolutionär konserviert**

Die Signalsequenz des Prepro-Alpha-faktors interagiert beim cotranslationalen Transport durch die ER-Membran der Säuger in ähnlicher Weise mit dem Säugerhomologen des Sec61p, Sec61 $\alpha$ , wie mit dem Sec61p beim posttranslationalen Transport durch die ER-Membran der Hefe, da in beiden Fällen innerhalb des hydrophoben Bereichs der Signalsequenz das gleiche positions-abhängige Quervernetzungsmuster auftritt (Anlage 3; Abbildung 4D). Eine systematische Quervernetzungsstudie zeigte weiterhin, daß sich die Signalsequenz des cotranslational in die ER-Membran der Säuger inserierten Prepro-Alpha-faktors bei einer Kettenlänge von 86 Aminosäuren ebenso wie im Hefesystem in der Nachbarschaft zu Lipiden befindet. Darüber hinaus flankiert das Säugerprotein TRAM die Signalsequenz in ähnlicher Weise wie die beiden Hefeproteine Sec62p und Sec71p (Anlage 3; Abbildung 3F). Die Bindungsstelle der Signalsequenz eines anderen Preproteins (Preprolaktin) wird ebenfalls in spezifischer Weise von Sec61 $\alpha$  und TRAM an der Grenzfläche zur Lipidschicht gebildet (Martoglio et al., 1995; Mothes et al., 1998). Im Fall des Preprolaktin ist der Sec61p-Komplex in rekonstituierten Membranen allerdings hinreichend und notwendig für die Erkennung der Signalsequenz und den anschließenden cotranslationalen Transport durch die Membran (Jungnickel und Rapoport, 1995).

Diese Ergebnisse weisen auf eine generelle Rolle des Sec61p in der Signalsequenzerkennung hin. Dafür sprechen auch Erkenntnisse über den Transport von Proteinen durch die Plasmamembran von *E.coli*. Mutationen, die die Sekretion von Proteinen mit defekten oder sogar fehlenden Signalsequenzen durch die Plasmamembran von *E.coli* erlauben (*prl* Mutationen), wurden hauptsächlich in dem *secY* Gen, das das Homologe des Sec61p in *E.coli* kodiert, gefunden, und zu einem geringen Ausmaß auch in den *secE*, *secG* und *secA* Genen. Interessanterweise sind die *prl* Mutationen des *secY* (als *prlA* bezeichnet) fast alle in den Transmembrandomänen 7 und 10 sowie in dem periplasmatischen Loop-Abschnitt zwischen den Transmembrandomänen 1 und 2 des SecY lokalisiert (Osborne und Silhavy, 1993). Diese Bereiche des SecY üben vermutlich unterschiedliche Funktionen im Prozeß der Signalsequenz-erkennung aus (siehe unten). Die Transmembrandomäne 7 des SecY ist direkt an der Erkennung von Signalsequenzen beteiligt (Sako, 1991). Da die meisten *prlA* Mutationen der Transmembran-domäne 7 auf einer Seite einer theoretischen  $\alpha$ -Helix liegen, nimmt man an, daß diese Transmembrandomäne normalerweise mit funktionellen, aber nicht mit defekten Signalsequenzen interagiert (Osborne und Silhavy, 1993). Es wurde vorgeschlagen, daß *prlA* Mutationen in der Transmembrandomäne 7 ein Zurückstoßen defekter Signalsequenzen (proof-reading) verhindern (Osborne und Silhavy, 1993). Allerdings gibt es bisher in keinem der untersuchten Translokationssysteme direkte Hinweise darauf, daß der Prozeß der Signalsequenzerkennung mit einem Zurückstoßen defekter Signalsequenzen, das vermutlich Energie verbrauchen würde, gekoppelt ist.

Eine generelle Rolle der Transmembrandomänen 2 und 7 bei der Interaktion mit Signalsequenzen könnte auch die Erklärung dafür sein, daß zwei der drei am besten zwischen SecY und Sec61p konservierten Sequenzabschnitte in diesen Transmembrandomänen enthalten sind (Görlich et al., 1992). Man könnte spekulieren, daß die beiden im Säugersystem beobachteten Sec61 $\alpha$ -Quervernetzungsprodukte unterschiedlicher Mobilität in Analogie zum Hefesystem Vernetzungsprodukten zu den Transmembrandomänen 2 und 7 des Sec61 $\alpha$  entsprechen.

Die beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Signalsequenzbindungsstelle innerhalb der Membran sowohl zwischen Pro- und Eukaryonten als auch zwischen co- und posttranslationalen Transportsystemen konserviert ist. Trotz der verschiedenen Targetingprozesse und Möglichkeiten, wie die Direktionalität des Transports erreicht wird, gleichen sich anscheinend alle Signalsequenz-vermittelten Transportwege im Mechanismus der Signalsequenzerkennung innerhalb der Membran. Signalsequenzen interkalieren offensichtlich generell in eine hydrophobe Umgebung, die von definierten Transmembrandomänen gebildet wird und Lipidmolekülen zugänglich ist.

Hydrophobe Interaktionen sind vermutlich auch bei der Erkennung von Signalsequenzen durch die cytosolische Targetingkomponente SRP54 beim cotranslationalen Transport von entscheidender

Bedeutung (siehe Einleitung). Trotzdem werden wahrscheinlich im Cytosol durch SRP und in der Membran durch die große Untereinheit des Sec61p-Komplexes nicht exakt dieselben strukturellen Merkmale der Signalsequenz geprüft. Im cotranslationalen Säugersystem wurde gezeigt, daß einige Signalsequenzmutanten des Modellproteins Preprolaktin, die kaum in ihrer Interaktion mit SRP gestört sind, deutliche Translokationsdefekte aufweisen, da ihre Signalsequenzen nicht von dem Sec61p-Komplex in der Membran erkannt werden (Jungnickel und Rapoport, 1995). Auch im Fall des Plasminogenaktivator-Inhibitors 2, dessen Sekretion in Abhängigkeit vom Differenzierungsstatus der Zelle reguliert wird, wird nur ein Teil der SRP-gebundenen naszierenden Polypeptidketten durch die Membran transportiert (Belin et al., 1996). Allerdings weist die Tatsache, daß Proteine, egal ob sie cotranslational und SRP-abhängig oder posttranslational und SRP-unabhängig zur ER-Membran der Hefe gelangen, von dem Sec61p-Komplex in der Membran erkannt werden müssen, um in das Lumen des ER transportiert zu werden, darauf hin, daß der Sec61p-Komplex bzw. seine große Untereinheit ein größeres Spektrum an Signalsequenzen erkennt, als der cytosolische Signalsequenzrezeptor SRP54.

### **3.3. Die Assemblierung des Translokationskanals und die Erkennung der Signalsequenz sind vermutlich aufeinanderfolgende Schritte beim co- und posttranslationalen Transport in das ER der Eukaryonten**

Der heterotrimere Sec61p-Komplex ist die zentrale Komponente des post- und auch des cotranslationalen Translokationsapparates in der ER-Membran. Die vorliegende Arbeit zeigt, daß der gereinigte Sec61p-Komplex in Detergenzlösung in Form von oligomeren Ringstrukturen mit einem Durchmesser von  $\sim 82\text{\AA}$  und einer zentralen Pore von  $\sim 21\text{\AA}$  vorliegt. Diese oligomeren Strukturen des Sec61p entsprechen vermutlich den proteinleitenden Kanälen der ER-Membran, deren Existenz zuvor beim cotranslationalen Transport im Säugersystem mit elektrophysiologischen und spektroskopischen Methoden nachgewiesen wurde (Simon und Blobel, 1991; Crowley et al., 1993; 1994). Dafür spricht, daß ihre Bildung in rekonstituierten Membranen im posttranslationalen Modus durch die Interaktion mit dem tetrameren Sec62/63p-Komplex oder im cotranslationalen Modus durch die Bindung von Ribosomen induziert werden kann. Darüber hinaus ist das Sec61p-Oligomer in Detergenzlösung und in Abwesenheit einer naszierenden Kette so an das Ribosom gebunden, daß der Tunnel in der großen Untereinheit des Ribosoms, durch den die naszierende Kette vermutlich das Ribosom verläßt, genau in den Mittelpunkt des oligomeren Sec61p-Komplexes mündet (auch von Beckmann et al. (1997) beobachtet). Die naszierende Kette könnte so beim cotranslationalen Transport durch einen kontinuierlichen Kanal transportiert werden, der sich vom Peptidyltransferase-Zentrum im Ribosom durch das Sec61p-Oligomer in der Membran bis in das Lumen des ER erstreckt.

Eine Interaktion mit dem Translokationssubstrat ist anscheinend für die Oligomerisierung des Sec61p-Komplexes im co- und posttranslationalen Transportprozeß nicht erforderlich. Im posttranslationalen

System sind vermutlich Sec62p und/oder Sec63p für die Oligomerisierung des Sec61p-Komplexes in Membranen verantwortlich, da die anderen beiden Untereinheiten des tetrameren Sec62/63p-Komplexes im Gegensatz zu Sec62p und Sec63p keine essentiellen Proteine der Hefe sind (Kurihara und Silver, 1993; Feldheim et al., 1993; Feldheim und Schekman, 1994).

Die Struktur des Sec61p-Komplexes ist ebenso wie der Mechanismus der Signalsequenz-erkennung evolutionär konserviert. Die homologen Komplexe des Säugers und der Bakterien bilden in Detergenzlösung ringähnliche Strukturen, die denen des Sec61p-Komplexes der Hefe gleichen (Anlage 1 und Meyer et al., 1999). In Analogie zum Hefesystem wird die Bildung der Oligomere des Sec61p-Komplexes der Säuger in rekonstituierten Membranen erst durch den Zusatz von Ribosomen induziert (Anlage 1).

Da die Bindung des Ribosoms an den Sec61p-Komplex der Säuger beim cotranslationalen Transport der Signalsequenzerkennung vorausgeht (Jungnickel und Rapoport, 1995) und sich naszierende Ketten innerhalb der Membran in dem Stadium vor der Signalsequenzerkennung bereits in einer hydrophilen, zum Cytosol hin abgeschlossenen Umgebung befinden (Crowley et al., 1993), interagiert die Signalsequenz beim cotranslationalen Transport offensichtlich erst mit dem assemblierten Translokationskanal in spezifischer Weise. Diese Annahme läßt sich auch auf den posttranslationalen Transport der Hefe übertragen, denn nur die beiden Teilkomplexe des Sec-Komplexes zusammen sind in der Lage, in Membranen oligomere Strukturen zu bilden und die Signalsequenz des Prepro-Alpha-faktors zu binden. Die Assemblierung des Kanals und die Erkennung der Signalsequenz sind offensichtlich getrennte Schritte des Transportprozesses, das eine anscheinend die Voraussetzung für das andere. Es ist denkbar, daß die Bindungsstelle der Signalsequenz von den Transmembrandomänen 2 und 7 verschiedener Sec61p-Moleküle gebildet wird und daher nur im assemblierten Translokationskanal vorliegt. Quervernetzungsexperimente im posttranslationalen Hefesystem, in denen photoreaktive Lysyl-Derivate an Positionen auf gegenüberliegenden Seiten der Signalsequenzhelix des Prepro-Alpha-faktors eingebaut wurden, deuten allerdings darauf hin, daß beide Transmembrandomänen einem einzigen Sec61p-Molekül des Sec-Komplexes zuzuordnen sind (nicht gezeigte Daten). Möglicherweise sind mit der Oligomerisierung einhergehende Konformationsänderungen in einem einzelnen Sec61p-Molekül von Bedeutung für die Bildung der Signalsequenzbindungsstelle.

### **3.4. Die Öffnung des Translokationskanals im co- und posttranslationalen Transportprozeß**

Die Assemblierung des Translokationskanals und seine Öffnung müssen unabhängig voneinander erfolgen, um die Funktion der ER-Membran als Permeabilitätsbarriere für kleine Moleküle in der Abwesenheit der zu transportierenden Polypeptidkette zu gewährleisten. Beim cotranslationalen Transport sind die mit der Öffnung einhergehenden strukturellen Veränderungen im Translokationskanal beträchtlich, da sein innerer Durchmesser nach der Öffnung zum ER-Lumen 40-60Å beträgt (Hamman et



al., 1997). Das deutet darauf hin, daß die von uns in Detergenzlösung beobachteten Ringstrukturen mit einer zentralen Pore von ungefähr 21 Å vermutlich geschlossenen Kanälen entsprechen. Die Pore könnte durch bewegliche Domänen ausgefüllt sein, die bei der erreichten Auflösung nicht sichtbar sind.

Beim cotranslationalen Transport bleibt das Ribosom nach der Insertion der Kette und Öffnung des Kanals während der gesamten Synthese eines sekretorischen Proteins fest an der Membran gebunden (Matlack und Walter, 1995; Hedge und Lingappa, 1996; Mothes et al., 1997) und könnte so gewährleisten, daß die Permeabilitätsbarriere der Membran aufrechterhalten wird, obwohl der geöffnete Kanal relativ groß ist (Crowley et al., 1993, 1994; Hamman et al., 1997). Beim posttranslationalen Transport von Proteinen ist leicht vorstellbar, daß der Kanal nur so weit geöffnet wird, daß die Polypeptidkette gerade hindurchpaßt, kleine Moleküle aber ausgeschlossen werden.

### ***Die Signalsequenz öffnet vermutlich den Kanal***

Vermutlich führt die Bindung der Signalsequenz in allen Signalsequenz-abhängigen Transportprozessen direkt zur Öffnung des Translokationskanals. Diese Annahme wird durch drei Experimente gestützt: Nach Zugabe synthetischer Signalpeptide konnten mit elektrophysiologischen Methoden in der Plasmamembran von *E.coli* Kanäle gemessen werden (Simon und Blobel, 1992). In Säugern öffnet sich der Translokationskanal zum Lumen, wenn die membrangebundene naszierende Kette bei ihrem cotranslationalen Transport die für die Signalsequenzerkennung erforderliche Länge erreicht (Crowley et al., 1994; Jungnickel und Rapoport, 1995). Im posttranslationalen Transportsystem der Hefe ermöglichen Antikörper, die an den unmittelbar der Signalsequenz folgenden Abschnitt des Prepro-Alpha-faktors binden, und anstelle des Kar2p in Proteoliposomen eingeschlossen werden, die Translokation des Prepro-Alpha-faktors in die Vesikel (Matlack et al., 1999). Dieses Experiment zeigt, daß der Teil des Prepro-Alpha-faktors, gegen den die Antikörper gerichtet sind, nach seiner Bindung an den Sec-Komplex auf der luminalen Seite der Membran zugänglich ist; der Kanal muß also geöffnet sein. Es ist allerdings nicht ausgeschlossen, daß die Kanäle in rekonstituierten Proteoliposomen ständig geöffnet sind. In diesem Zusammenhang ist es interessant zu prüfen, ob in rekonstituierten Membranen elektrophysiologisch nachweisbare Kanäle existieren, deren Aktivität durch Signalpeptide reguliert wird.

Offensichtlich sind nicht nur die Struktur des Translokationskanals, die Signalsequenzbindungs-stelle und die Signalsequenzen selbst evolutionär konserviert, sondern auch die Signalsequenz-abhängige, auf Protein-Protein Wechselwirkungen beruhende Öffnung des Translokationskanals.

### ***Ein Modell, das die Öffnung des Kanals durch die Signalsequenz erklärt***

Zahlreiche genetische und biochemische Experimente zeigen, daß die beiden Untereinheiten SecY und SecE des SecYEG-Komplexes von *E.coli* direkt miteinander interagieren (zur Übersicht Ito, 1995). Der synthetisch lethale Phänotyp zwischen bestimmten *prl* Mutationen in SecY und SecE deutet darauf hin,

daß der periplasmatische Loop-Abschnitt zwischen den Transmembrandomänen 1 und 2 des SecY mit dem ebenfalls im Periplasma liegenden C-Terminus des SecE bzw. die Transmembrandomänen 7 und 10 des SecY mit der Transmembrandomäne 3 des SecE interagieren (Osborne und Silhavy, 1993; Flower et al., 1995). Experimente mit einer dominant-negativen *secY* Mutante zeigten zusätzlich, daß die Transmembrandomäne 7 und der vorhergehende cytosolische Loop-Abschnitt des SecY eine Rolle in der Wechselwirkung mit SecE spielen (Baba et al., 1994). Dieser cytosolische Loop-Bereich des SecY kontaktiert wahrscheinlich den cytosolischen Loop-Abschnitt zwischen den Transmembrandomänen 2 und 3 des SecE (Pohlschröder et al., 1996). Es ist offensichtlich, daß vor allem die Bereiche des SecY, die *prl* Mutationen enthalten und daher vermutlich an der Erkennung von Signalsequenzen beteiligt sind (siehe oben), auch die Interaktion des SecY mit dem SecE vermitteln. In der Hefe gibt es eine ähnliche Korrelation: die Region, die die an die Signalsequenz des Prepro-Alpha-faktors bindende Transmembrandomäne 7 des Sec61p einschließt (diese Arbeit), ist wahrscheinlich auch für eine Interaktion des Sec61p mit dem Sss1p, dem Hefehomologen des SecE, von Bedeutung. Zum einen konnte Sss1p mit einem bifunktionellen Reagenz zu einem Bereich des Sec61p vernetzt werden, der die Transmembrandomänen 6 bis 8 umfaßt (Wilkinson et al., 1997), zum anderen wird durch die Überexpression von Sss1p die Funktionalität von *sec61* Mutanten, in denen der Loop-Abschnitt zwischen den Transmembrandomänen 7 und 8 des Sec61p verändert ist, wiederhergestellt (Wilkinson et al., 1997).

Aufgrund dieser Daten postulierten wir ein Modell, daß die Öffnung des Kanals für die Polypeptidkette durch die Signalsequenz folgendermaßen erklärt (Anlage 3): Signalsequenzen und Sss1p bzw. SecE binden an gleiche oder überlappende Regionen des Sec61p bzw. SecY. Am Beginn des Translokationsprozesses verdrängt die Signalsequenz Sss1p (SecE) von seiner Bindungsstelle im Sec61p (SecY) und induziert damit eine Konformationsänderung, die den Kanal für den hydrophilen Teil der Polypeptidkette öffnet. In dem zuvor geschlossenen Kanal wirkt Sss1p (SecE) als eine Ersatz-Signalsequenz. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, daß Sss1p und SecE in weitestem Sinne Signalsequenzen ähneln. Die essentielle und außerdem evolutionär konservierte Region des dreimal die Membran durchspannenden SecE besteht ebenso wie Sss1p nur aus einer Transmembrandomäne (TM3) und einigen umgebenden Aminosäuren auf beiden Seiten der Membran (Schatz et al., 1991; Hartmann et al., 1994). In Analogie zu Signalsequenzen ist für die Funktion der Transmembrandomäne 3 des SecE die Hydrophobizität entscheidend und nicht ihre exakte Aminosäuresequenz (Murphy und Beckwith, 1994). Sss1p (SecE) muß nach der Insertion der Signalsequenz nicht vollkommen vom Sec61p (SecY) freigesetzt werden, sondern könnte nur seine Position im Komplex ändern. Es ist denkbar, daß die Transmembrandomäne des Sss1p (TM3 des SecE) im geschlossenen Kanal mit der Transmembrandomäne 7 und im offenen Kanal mit der Transmembrandomäne 10 des Sec61p (SecY) interagiert. Letztere konnte in den Quervernetzungsexperimenten dieser Arbeit ebenso wie Sss1p nicht in der Nähe der Signalsequenz des Prepro-Alpha-faktors nachgewiesen werden, ist aber in *E.coli* für die Erkennung von Signalsequenzen von Bedeutung (siehe oben). Die oben erwähnte Wechselwirkung zwischen bestimmten cytoplasmatischen Bereichen des Sss1p (SecE) und Sec61p (SecY), in denen

bisher keine *prl* Mutationen identifiziert wurden, könnten in jedem Fall zur Stabilisierung des Komplexes beitragen.

Unser Modell sagt voraus, daß *prl* Mutationen in SecY oder SecE die Interaktion beider Proteine so ändern, daß SecE leichter durch die Signalsequenz, d.h. sogar durch solche, die defekt sind, verdrängt werden kann, wodurch der Kanal geöffnet wird. In Übereinstimmung damit konnte mit Coimmunopräzipitationen gezeigt werden, daß eine bestimmte *prlA* Mutante, die jeweils eine Mutation in den Transmembrandomänen 7 und 10 des SecY trägt (*prlA4*), nicht mehr fest mit SecE assoziiert ist (F. Duong, persönliche Mitteilung) und eine *prl* Mutation in der Transmembran-domäne 3 des SecE (*prlG1*) dessen Interaktion mit dem SecY schwächt (Pohlschröder et al., 1996).

### ***Zusätzliche Signale könnten bei der Öffnung des Kanals eine Rolle spielen***

Die Öffnung des Kanals könnte allerdings zusätzlich zur Signalsequenz weitere Signale erfordern. In *E.coli* könnte die Interaktion des SecYEG-Komplexes mit SecA eine Rolle spielen. Nur so kann man erklären, warum sekretorische Proteine, denen die Signalsequenz vollständig fehlt, von *prlA* Mutanten in SecB- und SecA-abhängiger Weise exportiert werden, cytosolische Proteine jedoch in keinem Fall (Derman et al., 1993; Flower et al., 1994; Prinz et al., 1996). Tatsächlich konnte gezeigt werden, daß die Membranen einer bestimmten *prlA* (*secY*)-Mutante SecA mit höherer Affinität binden als Wildtyp-Membranen (van der Wolk et al., 1998).

Ausgehend von Arbeiten, in denen die Umgebung der ausschließlich in der C-terminalen Hälfte des Wildtyp-Prepro-Alphafaktors gelegenen Lysine untersucht wurde, wurde spekuliert, daß Kar2p bei der Öffnung des Kanals beim posttranslationalen Transport von Proteinen in das ER der Hefe eine Rolle spielen könnte. In Mikrosomen der temperatursensitiven *kar2-159* Mutante ist die durch Quervernetzung zu Sec61p nachgewiesene Insertion des C-terminalen Teils des Prepro-Alphafaktors in den Sec61p-Kanal bei der restriktiven Temperatur verhindert, in Mikrosomen der *kar2-203* Mutante wird der C-terminale Teil des Prepro-Alphafaktors zwar noch in eine Sec61p-Umgebung inseriert, aber nicht transloziert (Sanders et al., 1992). Daraus wurde abgeleitet, daß Kar2p in zwei verschiedenen Phasen des posttranslationalen Transport-prozesses benötigt wird: für die Insertion der Kette in den Sec61p-Kanal und für den eigentlichen Transfer von Polypeptiden durch den Kanal (Sanders et al., 1992); erstere könnte der Öffnung des Kanals entsprechen. Diese Sicht wurde durch Quervernetzungsexperimente unterstützt, in denen gezeigt wurde, daß der Prepro-Alphafaktor in der ATP-unabhängigen Transportphase nur mit Sec62p, Sec71p und Sec72p interagiert und erst durch Kar2p und ATP in eine Sec61p-Umgebung übertragen wird (Müsch et al., 1992; Sanders et al., 1992; Lyman und Schekman, 1997). Wie schon erwähnt, ist allerdings zu beachten, daß in beiden experimentellen Ansätzen nur die Umgebung der Lysine des Wildtyp-Prepro-Alphafaktors analysiert wurde, die sich in der C-terminalen Hälfte der Polypeptidkette befinden, und nicht die Interaktionen der Signalsequenz. Wir konnten zeigen, daß die

Signalsequenz des Prepro-Alpha-faktors in nativen Membranen in Abwesenheit von ATP, in rekonstituierten Proteoliposomen ohne Kar2p und in Membranen der *kar2-159* Mutante in An- oder Abwesenheit von ATP die gleiche Bindungsstelle im Sec61p erreicht (Anlage 3 und nicht gezeigte Daten). Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß Kar2p nicht für die Erkennung der Signalsequenz und die Insertion der Kette in den Sec61p-Kanal erforderlich ist und damit vermutlich auch nicht für die Öffnung des Translokationskanals. Nach der Bindung an den Sec-Komplex könnte ein kleiner Teil der als Haarnadelstruktur in den Translokationskanal inserierten Polypeptidkette direkt für Kar2p auf der luminalen Seite der Membran zugänglich sein, wodurch der eigentliche Translokationsprozeß unmittelbar eingeleitet werden könnte. Es gibt in unserem Labor keine Hinweise darauf, daß Kar2p andere Funktionen als die des direkten Transfers der Polypeptidkette besitzt. Die früheren Ergebnisse stehen nur in scheinbarem Widerspruch dazu. Sie lassen sich einfacherweise damit erklären, daß Kar2p und ATP für den Transfer der C-terminalen Hälfte des Wildtyp-Prepro-Alpha-faktors in und durch den Sec61p-Kanal im zweiten Schritt des posttranslationalen Transportprozesses notwendig sind.

Beim cotranslationalen Transport von Proteinen in das ER der Eukaryonten ist es vorstellbar, daß die Erkennung der Signalsequenz vorausgehende Bindung des Ribosoms an den Sec61p-Komplex für die Öffnung des Kanals direkt erforderlich ist. Das Ribosom könnte zum Beispiel notwendig sein, um den geöffneten Kanal mit der 40-60Å großen Pore zu stabilisieren, was sich in dem mit der Signalsequenzerkennung einhergehenden Übergang von einer lockeren zu einer festen, d.h. salzresistenten Bindung des Ribosoms an die Membran ausdrücken könnte (Simon und Blobel; 1991; Jungnickel und Rapoport, 1995; Hamman et al., 1998).

### 3.5. Die Schließung des Translokationskanals

Am Ende der Translokation der Polypeptidkette muß sich der Kanal schließen. Es ist vorstellbar, daß die Signalsequenz unmittelbar nach ihrer Abspaltung den Translokationskanal verläßt, und somit nur für die Öffnung des Kanals, aber nicht für die Aufrechterhaltung des geöffneten Zustandes benötigt wird. Der Kanal könnte dann beim posttranslationalen Transport ausschließlich durch den reifen Teil der zu transportierenden Polypeptidkette offen gehalten werden und nach dem vollständigen Transport der Kette automatisch in seine geschlossene Konformation übergehen. Es ist unbekannt, ob der posttranslationale Kanal in nativen Membranen in jeder Translokationsrunde assembliert und deassembliert wird. Eine mit der Beendigung der Translokation einhergehende Deassemblierung des Kanals, die mit der Dissoziation des Sec-Komplexes in seine Teilkomplexe gleichzusetzen sein sollte, wäre vermutlich der einfachste und sicherste Weg, den Kanal in der Membran nach der Beendigung der Translokation zu schließen. In diesem Fall müßte es ein Signal geben, das zur Assemblierung des Kanals am Beginn einer neuen Translokationsrunde führt. Die Tatsache, daß sich der Sec-Komplex als eine stabile Einheit reinigen läßt und in rekonstituierten Membranen als Ringstruktur vorliegt, deutet allerdings darauf hin, daß der

Sec62/63p-Komplex und der Sec61p-Komplex in Membranen auch ständig miteinander assoziiert sein könnten.

Beim cotranslationalen Transport in Säugern ist die Freisetzung der Polypeptidkette mit Puromycin allein nicht ausreichend, um den Kanal zu verschließen; zusätzlich ist die Ablösung des Ribosoms von der ER-Membran mit Hochsalz erforderlich (Simon und Blobel, 1991). Durch diese Behandlung ändert sich die Zahl der im Elektronenmikroskop beobachtbaren oligomeren Ringstrukturen des Sec61p-Komplexes in der ER-Membran der Säuger allerdings nur unwesentlich (Anlage 1). Die Schließung des Kanals muß demnach beim cotranslationalen Transport nicht mit seiner Deassemblierung einhergehen. Die Ringstrukturen des Sec61p-Komplex bleiben auch bestehen, wenn die mit Puromycin und Hochsalz behandelten ER-Membranen der Säuger solubilisiert und anschließend wieder rekonstituiert werden (Anlage 1). Im Gegensatz dazu dissoziieren die in Detergenzlösung vorliegenden Ringstrukturen des gereinigten Sec61p-Komplexes bei ihrer Integration in die Lipidschicht. Möglicherweise stabilisieren andere Membranproteine die Sec61p-Oligomere in nativen Membranen in der Abwesenheit von Ribosomen. Der den cotranslationalen Transport vermittelnde, aus dem Sec61p-Komplex gebildete Kanal könnte daher in nativen ER-Membranen ständig assembliert sein und durch die Signalsequenz des Translokationssubstrats geöffnet bzw. durch Konformationsänderungen im Ribosom am Ende der Translation und das Entlassen der naszierenden Polypeptidkette geschlossen werden (auch Hamman et al., 1998). Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß die physiologische Termination der Translation im Gegensatz zur Puromycin-Hochsalzbehandlung die Deassemblierung des Kanals bewirkt, indem zum Beispiel der stabilisierende Effekt anderer Membranproteine herabgesetzt wird. In diesem Fall würde das Ribosom in der Targetingphase des cotranslationalen Transports die Oligomerisierung des Sec61p-Komplexes auslösen. Es wäre interessant zu wissen, ob in rekonstituierten Membranen die durch Ribosomen induzierten Ringstrukturen des gereinigten Sec61p-Komplexes bestehen bleiben, wenn die Ribosomen durch Hochsalz von der Membran abgelöst werden.

Kürzlich wurde vorgeschlagen, daß der Translokationskanal beim cotranslationalen Transport in das ER der Säuger nicht selbst zwischen einem geschlossenen und offenen Zustand wechselt, sondern an seinem luminalen Ende durch BiP, das Säugerhomologe des Kar2p, in einer Nukleotid-abhängigen Weise verschlossen wird (Hamman et al., 1998). Die Bedeutung dieses Ergebnisses ist bisher unklar, denn keines der Proteine des cotranslationalen Translokationsapparates besitzt eine J-Domäne. Experimente in unserem Labor zeigten, daß BiP durch eine J-Domäne für die Bindung von Polypeptiden (welche zum Beispiel Proteine des Sec61p-Komplexes sein könnten) aktiviert werden muß (Misselwitz et al., 1998). Da der cotranslationale Transport von Proteinen in das ER der Säuger mit rekonstituierten Proteoliposomen, die den Sec61p-Komplex, TRAM und den SRP-Rezeptor enthalten, reproduziert werden kann (Görlich et al., 1993), wäre der Verschluß des Kanals durch BiP nicht essentiell für den eigentlichen cotranslationalen Transfer von Proteinen durch die ER-Membran der Säuger.

### 3.6. Mögliche Funktion der beiden zur Signalsequenz vernetzbaren Proteine Sec62p und Sec71p im posttranslationalen Transport

Die Quervernetzungsexperimente der vorliegenden Arbeit zeigen, daß die beiden Proteine Sec62p und Sec71p die Signalsequenz des an den Sec-Komplex gebundenen Prepro-Alphafaktors im posttranslationalen Hefesystem auf nur einer Seite flankieren und sich in größerer Entfernung zur Signalsequenz als Sec61p befinden. Außerdem sind Sec62p und Sec71p neben Sec72p in der Nachbarschaft des reifen Teils des Prepro-Alphafaktors nachweisbar, bevor dieser Kar2p-abhängig durch den Sec61p-Kanal transportiert wird. Welche Funktionen Sec62p und Sec71p beim posttranslationalen Transport in das ER der Hefe besitzen, ist bisher nur wenig untersucht und vollkommen unverstanden. Klar ist jedoch, daß Sec71p von geringerer Bedeutung für den Translokationsprozeß ist als das für die Hefezelle essentielle Sec62p (Deshaies und Schekman, 1989). Allerdings führt die Deletion des *SEC71* Gens bei erhöhten Temperaturen zur Akkumulation von unprozessierten Precursoren im Cytosol der Hefezelle (Feldheim et al., 1993).

Die Oligomerisierung des Sec61p-Komplexes der Hefe an sich ist für die Erkennung der Signalsequenz im ersten Schritt des posttranslationalen Transport nicht ausreichend. Es konnte gezeigt werden, daß die Signalsequenz des Prepro-Alphafaktors in Detergenzlösung in Anwesenheit von Lipiden zwar spezifisch mit dem gereinigten heptameren Sec-Komplex interagieren kann, aber nicht mit dem Sec61p-Komplex, der unter diesen Bedingungen in oligomerer Form vorliegt (Matlack et al., 1997 und nicht gezeigte Daten). Der Sec62/63p-Teilkomplex des Sec-Komplexes muß demnach in Membranen zusätzlich zur Oligomerisierung des Sec61p-Komplexes andere Funktionen in der frühen Phase des posttranslationalen Transports besitzen. Die Proteine des Sec62/63p-Komplexes könnten zum Beispiel für die Freisetzung der cytosolischen Interaktionspartner von dem zu transportierenden Protein erforderlich sein, die der Signalsequenzerkennung vorausgehen muß. Allerdings bindet auch die Signalsequenz eines Harnstoffdenaturierten Prepro-Alphafaktors nicht spezifisch an den oligomeren Sec61p-Komplex in Detergenzlösung (nicht gezeigte Daten). Es ist daher naheliegend anzunehmen, daß speziell die beiden zur Signalsequenz vernetzbaren Untereinheiten des Sec62/63p-Komplexes eine Rolle bei der Signalsequenzerkennung im posttranslationalen Transportprozeß der Hefe spielen. Diese Sicht wird durch die Tatsache unterstützt, daß das Säugerprotein TRAM in ähnlicher Weise wie die beiden Hefeproteine Sec62p und Sec71p zur Signalsequenz des Prepro-Alphafaktors vernetzt wird. Es ist bekannt, daß TRAM während der Phase des cotranslationalen Transportprozesses wirkt, in der die Signalsequenz in der Membran erkannt wird (Voigt et al., 1996). Sec62p und Sec71p könnten eine Funktion bei der Erkennung von Signalsequenzen direkt über die Bindung von Signalsequenzen ausüben, oder indirekt über eine Beeinflussung der Konformation des oligomeren Sec61p-Komplexes.

Der Translokationskanal ermöglicht nicht nur den Transfer von hydrophilen Teilen der Polypeptidkette durch die Membran, sondern auch die Integration von Transmembrandomänen der Membranproteine in

die Lipidschicht. Die Bindungsstelle der Signalsequenz an der Grenzfläche des Translokationskanals und der Lipiddoppelschicht könnte auch der Ort sein, an dem Transmembrandomänen erkannt werden, denn die Transmembrandomänen von verschiedenen Modellproteinen befinden sich im cotranslationalen Säugersystem unmittelbar nach ihrer Insertion in den Translokationskanal in der Nähe von Lipiden, Sec61 $\alpha$  und TRAM (Martoglio et al., 1995), von Lipiden und Sec61 $\alpha$  (Mothes et al., 1997), oder von Sec61 $\alpha$  und TRAM (Do et al., 1996; die Nachbarschaft zu Lipiden wurde hier nicht analysiert). Da in den verschiedenen Quervernetzungsexperimenten nur die Umgebung von sehr wenigen Positionen der Transmembrandomänen untersucht wurde, ist bisher nicht bekannt, ob Transmembran-domänen tatsächlich in spezifischer Weise mit dem Sec61 $\alpha$  und TRAM interagieren, d.h. ob sie ähnlich spezifisch wie Signalsequenzen gebunden werden.

Transmembrandomänen unterscheiden sich von Signalsequenzen vor allem durch die Länge des hydrophoben Bereiches. Im Falle von solchen Membranproteinen, die keine Signalsequenz besitzen, übernimmt die erste Transmembrandomäne die Targetingfunktion der Signalsequenz. Man könnte annehmen, daß für die Erkennung hydrophober Sequenzen durch den Translokationskanal die wenigen hydrophoben Aminosäuren von Signalsequenzen ausreichend sind, für die sofortige Freisetzung von dem gleichen Bindungsort in die Lipidschicht allerdings die 20 hydrophoben Aminosäuren von Transmembrandomänen erforderlich sind.

TRAM bzw. Sec62/71p könnten sich genau dort befinden, wo sich der Sec61p-Kanal seitlich zur Lipidschicht öffnet und Transmembrandomänen in die Lipidschicht entlassen werden. In Übereinstimmung damit wurde gezeigt, daß die Transmembrandomäne eines Modellproteins nachdem sie den Sec61p-Kanal seitlich verlassen hat, bis zum Ende der Translation in der Umgebung des TRAM verbleibt (Do et al., 1996). TRAM bzw. Sec62/71p könnten demnach den Transfer von Transmembrandomänen aus dem Sec61p-Kanal in die Lipidschicht vermitteln. Eine weitere Funktion des Sec62/63p-Komplexes könnte auch die Verhinderung der Ribosomen-bindung beim posttranslationalen Transport sein.

Ob Sec62p und Sec71p tatsächlich funktionale Homologe des TRAM in der Hefe sind, ist nicht bekannt. Außerdem ist zum Beispiel noch nicht untersucht worden, ob der gereinigte Sec-Komplex überhaupt die Integration von Membranproteinen in das ER der Hefe ermöglicht. Es könnte aufschlußreich sein, den Sec62/63p-Komplex zu dissoziieren und die Funktionen der einzelnen Untereinheiten im posttranslationalen Transport zu charakterisieren. Darüber hinaus wäre es interessant zu prüfen, ob ein Protein in der ER-Membran der Hefe existiert, das die Funktion des Säugerproteins TRAM beim cotranslationalen Transport von Proteinen übernimmt.

### 3.7. Die Interaktion zwischen dem Sec61p-Komplex und dem Ribosom beim cotranslationalen Transport

Während des cotranslationalen Transports von Proteinen in das ER der Eukaryonten interagiert der Sec61p-Komplex direkt mit dem Ribosom. In Detergenzlösung befindet sich das Sec61-Oligomer der Hefe in der Abwesenheit einer naszierenden Kette in einem Abstand von 15-20Å zur großen Untereinheit des Hefe-Ribosoms und ist nur an einer einzigen Stelle erkennbar mit dem Ribosom verbunden (vorliegende Arbeit und auch Beckmann et al., 1997). Der gleiche Abstand konnte auch in rekonstituierten Membranen beobachtet werden. Dieses Ergebnis wirft die Frage auf, wie bei einem so großen Abstand die Permeabilitätsbarriere der Membran während des cotranslationalen Transports von Proteinen aufrechterhalten werden kann. Es ist einerseits vorstellbar, daß andere Komponenten des Cytosols oder der Membran die Lücke zwischen Translokationskanal und Ribosom verschließen und somit den Durchtritt von kleinen Molekülen durch den geöffneten Sec61p-Kanal verhindern. Andererseits könnten auch flexible Loop-Abschnitte des Sec61p-Komplexes oder Protein- bzw. RNA-Strukturen des Ribosoms in die Lücke hineinreichen, die bei der mit unserer Methode erreichten Auflösung von 30Å vermutlich nicht sichtbar sind oder durch ihre Flexibilität nicht als definierte Strukturen bei dieser Art von Bildaufbereitung auszumachen sind.

Im Säugersystem gibt es Hinweise darauf, daß sich die Natur der Interaktion zwischen dem Sec61p-Komplex und dem Ribosom beim cotranslationalen Transport in Abhängigkeit von der naszierenden Kette ändert. Ribosomen mit kurzen naszierenden Ketten binden ebenso wie Ribosomen, die keine naszierende Ketten tragen, nur schwach an den Sec61p-Komplex in der Membran. Sie sind durch hohe Salzkonzentrationen von dem Sec61p-Komplex ablösbar (Kalies et al., 1994; Jungnickel und Rapoport, 1995). Die Interaktion zwischen dem Sec61p-Komplex und dem Ribosom wird hochsalzresistent, sobald die naszierende Kette die kritische Länge erreicht, bei der ihre Signalsequenz in der Membran erkannt und der Translokationskanal geöffnet wird (Crowley et al., 1994; Jungnickel und Rapoport, 1995). Es ist leicht vorstellbar, daß der Übergang von der schwachen zur festen Bindung, d.h. möglicherweise die Öffnung des Kanals, mit einer Verringerung des Abstandes zwischen dem Sec61p-Kanal und dem Ribosom einhergehen könnte, wodurch die Permeabilitätsbarriere der Membran nach der Öffnung des Kanals aufrechterhalten wäre. Dieser Hypothese steht jedoch die Tatsache gegenüber, daß sowohl kurze als auch lange naszierende Ketten nach der Bindung des Ribosoms an die ER-Membran der Säuger von der cytosolischen Seite der Membran aus für kleine Moleküle unzugänglich sind, d.h. Fluoreszenzsonden in membrangebundenen naszierenden Polypeptidketten sind schon vor der Öffnung des Translokationskanals für Fluoreszenzlöcher wie Jodid- oder  $\text{NAD}^+$ - Ionen nicht vom Cytosol aus erreichbar (Crowley et al., 1993; 1994; Hamman et al., 1997). Der dichte Abschluß des Translokationskanals zum Cytosol geht in nativen Membranen offensichtlich seiner Öffnung zum Lumen voraus und könnte schon durch die Bindung von Ribosomen ohne naszierende Ketten gewährleistet sein. Es wird aufschlußreich sein, die Struktur des Ribosom-Sec61p-Komplexes mit naszierenden Ketten



definierter Länge zu ermitteln, und diese in einer erhöhten, idealerweise atomaren Auflösung darzustellen, um herauszufinden, ob die Lücke zwischen Kanal und Ribosom durch bewegliche Domänen ausgefüllt ist, und ob sich der Abstand während des Translokationsprozesses verringert.

Im Säugersystem ist die Ribosom-Membran-Interaktion nicht für alle sekretorischen Proteine stabil. Für einige Proteine ist sie durch Translokations-Haltesignale reguliert. Das nicht genau definierte Haltesignal ist in der Lage, die feste Bindung zwischen dem Ribosom und der Membran aufzubrechen. Dadurch akkumulieren bestimmte Abschnitte der naszierenden Kette vorübergehend im Cytosol, und sind dort zum Beispiel für Proteasen zugänglich, bevor sie in das ER transportiert werden (Hedge und Lingappa, 1996; Hedge et al., 1998). Eine ähnliche Situation besteht bei der Synthese cytosolischer Domänen von Membranproteinen: sie erscheinen während ihrer Synthese an membrangebundenen Ribosomen im Cytosol (Do et al., 1996; Mothes et al., 1997). In beiden Beispielen ist die Ribosom-Sec61p-Interaktion offensichtlich so geändert, daß unter Erhalt der Ribosomenbindung eine Synthese der Kette in das Cytosol ermöglicht wird. Möglicherweise ist das Ribosom in diesen Fällen hauptsächlich über die in der dreidimensionalen Struktur sichtbare Verbindung (Ausstülpung) asymmetrisch am Translokationskanal verankert und flexibler im Verhältnis zu Sec61p.

Experimente, in denen die Zugänglichkeit von Fluoreszenzsonden in einem Typ1-Membranprotein für Fluoreszenzlöcher untersucht wurde, deuten auf einen Mechanismus, nach dem eine gerade synthetisierte Transmembrandomäne noch während sie sich im Ribosom befindet strukturelle Veränderungen auslöst, die den Translokationskanal zum Lumen hin schließen und wenig später die Ribosom-Membran-Interaktion zum Cytosol aufbrechen (Liao et al., 1997). Die Permeabilitätsbarriere der Membran könnte demnach während der Synthese cytosolischer Domänen dadurch aufrechterhalten werden, daß sich der Kanal zum Lumen hin verschließt, bevor der Verschluß durch das Ribosom an seinem cytosolischen Ende aufgehoben wird.

Die Dynamik der Ribosom-Membran-Interaktion und des Translokationskanals beim cotranslationalen Transport besser zu verstehen, wird eine interessante Aufgabe der Zukunft sein.

### **3.8. Die co- und posttranslationale Translokation von Proteinen in das ER der Hefe - der neu-entdeckte Ssh1p-Komplex und die Rolle der Sbh1p-Untereinheit des Sec61p-Komplexes**

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß ein dem Sec61p-Komplex homologer heterotrimerer Komplex in der ER-Membran der Hefe existiert, der aus den Untereinheiten Ssh1p, Sbh2p und Sss1p besteht. Es gibt Hinweise darauf, daß der Ssh1p-Komplex am cotranslationalen Proteintransport beteiligt ist. Er interagiert wie der Sec61p-Komplex mit membrangebundenen Ribosomen und bildet in Detergenzlösung oligomere Ringstrukturen. Im Gegensatz zum Sec61p-Komplex ist der Ssh1p-Komplex nicht in der Lage, sich mit

dem Sec62/63p-Komplex zu einem heptameren Sec-Komplex zu verbinden, um den posttranslationalen Transport zu vermitteln - zumindest gibt es für eine stabile Wechselwirkung im Moment keinerlei Anhaltspunkte. Ein Modell, nach dem der Ssh1p-Komplex ausschließlich im cotranslationalen und nicht im posttranslationalen Modus arbeitet, der Sec61p-Komplex dagegen in beiden, könnte erklären, warum der Ssh1p-Komplex für die Translokationsaktivität der Hefezelle von geringerer Bedeutung als der Sec61p-Komplex ist, obwohl beide heterotrimere Komplexe ungefähr in gleichen Mengen vorliegen. Der posttranslationale Transport von Proteinen könnte für die Hefe besonders wichtig sein, denn die Untereinheiten Sec62p und Sec63p des Sec62/63p-Komplexes sind essentielle Proteine der Hefe und nahezu vollständig in dem gereinigten Sec-Komplex enthalten (Panzner et al., 1995). Eine Funktion des Ssh1p- und des Sec61p-Komplexes der Hefe im cotranslationalen Transportprozeß konnte bisher nicht direkt gezeigt werden, da entsprechende *in vitro* Systeme fehlen.

Die Frage, warum zwei cotranslationale Translokationsapparate in der ER-Membran der Hefe existieren, ist vollkommen ungeklärt. Es ist vorstellbar, daß die beiden heterotrimeren Komplexe unterschiedliche Substratspektren besitzen. In diesem Fall könnten verschiedene cytosolische Targetingmechanismen zum Ssh1p- bzw. Sec61p-Komplex in der Membran führen und der Ssh1p-Komplex nur nicht-essentielle Proteine der Hefezelle transportieren. Alternativ könnte ein zweites cotranslationales Transportsystem eine unabhängige Regulation der co- und posttranslationalen Transportprozesse ermöglichen. Über das dynamische Verhalten der Transportsysteme der ER-Membran der Hefe ist jedoch nur wenig bekannt. Der Ssh1p-Komplex ist zu einem Großteil mit Digitonin aus der Membran exponentiell wachsender Hefen extrahierbar, ungefähr 20% sind mit membrangebundenen Ribosomen assoziiert. Demgegenüber liegen 40% des Sec61p-Komplexes in freier Form vor, 10-20% in Assoziation mit membrangebundenen Ribosomen und der Rest in Verbindung mit dem Sec62/63p-Komplex. Die freien Sec61p- und Ssh1p-Komplexe könnten einen Pool inaktiver Moleküle bilden, der bei Bedarf schnell in die entsprechende aktive Form überführt werden kann. Ob der Sec-Komplex in Membranen tatsächlich in seine beiden Teilkomplexe zerfällt und im Gleichgewicht mit dem freien Sec61p-Komplex steht, ist unklar. Wir fanden, daß zumindest Ribosomen nicht in der Lage sind, den Sec-Komplex in Membranen zu dissoziieren, denn sie binden nicht an rekonstituierte Proteoliposomen, die den Sec-Komplex enthalten (nicht veröffentlichte Daten). Wie sich Ribosomen mit naszierenden Polypeptidketten in diesem Zusammenhang verhalten, wurde bisher nicht untersucht.

Sbh1p ist die einzige Untereinheit des Sec61p-Komplexes bzw. Sec-Komplexes, die nicht in genetischen Screens entdeckt worden ist. Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals, daß Sbh1p und sein Homologes Sbh2p zur Translokationskapazität der Hefezelle beitragen. Obwohl die beiden Sbh-Proteine evolutionär konserviert sind, da sie der  $\beta$ -Untereinheit des Sec61p-Komplexes der Säuger verwandt sind, sind sie für den co- oder posttranslationalen Transport *in vivo* nicht absolut essentiell. In Übereinstimmung damit ist der posttranslationale Transport *in vitro* reduziert, aber nicht vollständig verhindert, wenn Sbh1p und Sbh2p fehlen. In welcher Weise die Sbh-Proteine den Translokationsprozeß beeinflussen, ist ungeklärt.

Untersuchungen im cotranslationalen Säugersystem deuten darauf hin, daß das Säugerhomologe Sec61 $\beta$  die produktive Insertion der naszierenden Kette in den Translokationskanal beschleunigt. Die Interaktion zwischen dem Ribosom und dem Sec61p-Komplex ist jedoch in der Abwesenheit der  $\beta$ -Untereinheit nicht gestört (Kalies et al., 1998). Es wurde außerdem vorgeschlagen, daß Sec61 $\beta$  bei der Bindung der Signalpeptidase an den Sec61p-Komplex eine Rolle spielt, da es ribosomenabhängig zu einer Untereinheit des Signalpeptidase-Komplexes vernetzt werden kann (Kalies et al., 1998).

Die  $\beta$ -Untereinheiten der eukaryontischen Sec61p-Komplexe haben keine Sequenzhomologie zu der dritten Untereinheit des SecYEG-Komplexes in *E.coli*; die Situation des SecG ist jedoch ähnlich. Zum einen ist SecG nicht essentiell, zum anderen ist ein dimerer Komplex aus SecY und SecE für die Translokation von Proteinen in rekonstituierte Proteoliposomen ausreichend, obwohl der Prozeß durch SecG deutlich stimuliert wird (Akimura et al., 1991; Nishiyama et al., 1993; 1994; Hanada et al., 1994; Duong und Wickner, 1997). Die dritte Untereinheit der heterotrimeren Komplexe (Sec61 $\beta$ , Sbh1p, Sbh2p bzw. SecG) ist offensichtlich von geringer Bedeutung für den Translokationsprozeß. Man könnte annehmen, daß der minimale Translokationsapparat in der Membran aus nur zwei Proteinen besteht: die große, mehrfach die Membran durchspannende  $\alpha$ -Untereinheit bildet den Kanal, die kleine  $\gamma$ -Untereinheit wird benötigt, um den Kanal in der Abwesenheit zu transportierender Polypeptidketten in einer geschlossenen Konformation zu halten.

Viele Fragen auf dem Gebiet der Translokation sind ungeklärt. Besonders interessant wäre es herauszufinden, ob der Kanal *in vivo* in jeder Translokationsrunde assembliert und deassembliert, wie Assemblierung und Deassemblierung reguliert sind, wie die Funktion der Membran als Permeabilitätsbarriere beim co- und posttranslationalen Transport tatsächlich aufrechterhalten wird, welche Funktion die einzelnen Untereinheiten des Sec62/63p-Komplexes besitzen, wie die Signalsequenz den Translokationskanal öffnet und wie der Kanal am Ende der Translokation geschlossen wird. Eine Erweiterung des Methodenspektrums wird notwendig sein, um diese wichtigen Fragen zufriedenstellend beantworten zu können.

#### 4. LITERATURVERZEICHNIS

- Akimura, J., Matsuyama, S.I., Tokuda, H., Mizushima, S. (1991) Reconstitution of a protein translocation system containing purified SecY, SecE, and SecA from *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:6545-6549.
- Akiyama, Y., Ito, K. (1987) Topology analysis of the SecY protein, an integral membrane protein involved in protein export in *Escherichia coli*. EMBO J. 6:3465-3470.
- Baba, T., Taura, T., Shimoke, T., Akiyama, Y., Yoshihisa, T., Ito, K. (1994) A cytoplasmic domain is important for the formation of a SecY-SecE translocator complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4539-4543.
- Beckmann, R., Bubeck, D., Grassucci, R., Penczek, P., Verschoor, A., Blobel, G., Frank, J. (1997) Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the ribosome-Sec61 complex. Science 278:2123-2126.
- Belin, D., Bost, S., Vassalli, J.D., Strub, K. (1996) A two-step recognition of signal sequences determines the translocation efficiency of proteins. EMBO J. 15:468-478.
- Bernabeu, C., Tobin, E.M., Fowler, A., Zabin, I., Lake, J.A. (1983) Nascent polypeptide chains exit the ribosome in the same relative position in both eucaryotes and procaryotes. J. Cell Biol. 96:1471-1474.
- Bernstein, H.D., Poritz, M.A., Strub, K., Hoben, P.J., Brenner, S., Walter, P. (1989) Model for signal sequence recognition from amino-acid sequence of 54k subunit of signal recognition particle. Nature 340:482-486.
- Biederer, T., Volkwein, C., Sommer, T. (1996) Degradation of subunits of the Sec61p complex, an integral component of the Er membrane, by the ubiquitin-proteasome pathway. EMBO J. 15:2069-2076.
- Bird, P., Gething, M.J., Sambrook, J. (1987) Translocation in yeast and mamalian cells: not all signal sequences are functionally equivalent. J. Cell Biol. 105:2905-2914.
- Blobel, G., and Dobberstein, B. (1975) Transfer of proteins across membranes. I Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane bound ribosomes of murine myeloms. II Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. J. Cell Biol. 67:835-862.
- Bost, S., Belin, D. (1997) *prl* mutations in the *Escherichia coli* *secG* Gene. J. Biol. Chem. 272:4087-4093.
- Briggs, M.S., Gierasch, L.M., Zlotnick, A., Lear, J.D., DeGrado, W.F. (1985) *In vivo* function and membrane binding properties are correlated for *Escherichia coli* LamB signal peptides. Science 228:1096-1099.
- Brightman, S.E., Blatch, G.L., Zetter, B.R. (1995) Isolation of a mouse cDNA encoding MTJ1, a new murine member of the DnaJ family of proteins. Gene 153:249-254.
- Brodsky, J.L., Schekman, R. (1993) A Sec63p-BiP complex from yeast is required for protein translocation in a reconstituted proteoliposome. J. Cell Biol. 123:1355-1363.

- Brown, J., Hann, B.C., Medzihradszky, K.F., Niwa, M., Burlingame, A.L., Walter, P. (1994) Subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* signal recognition particle required for its functional expression. *EMBO J.* 13:4390-4400.
- Brundage L., Hendrick, J.P., Schiebel, E., Driessen, A.J.M., Wickner, W. (1990) The purified *E.coli* integral membrane protein SecY/E is sufficient for reconstitution of SecA-dependent precursor protein translocation. *Cell* 62:649-657.
- Brunner, J., Senn, H., Richards, F.M. (1980) 3-Trifluoromethyl-3-phenyldiazirine. *J. Biol. Chem.* 255:3313-3318.
- Bukau, B., Horwich, A.L. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92:351-366.
- Caplan, A.J., Cyr, D.M., Douglas, M.G. (1992) YDJ1p facilitates polypeptide translocation across different intercellular membranes by a conserved mechanism. *Cell.* 71:1143-1155.
- Chirico, W.J., Waters, M.G., Blobel, G. (1988) 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature.* 332:805-810.
- Chirico, W.J. (1992) Dissociation of complexes between 70 kDa stress proteins and presecretory proteins is facilitated by a cytosolic factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189:1150-1156.
- Chou, M.M., Kendall, D.A. (1990) Polymeric sequences reveal a functional interrelationship between hydrophobicity and length of signal peptides. *J. Biol. Chem.* 265:2873-2880.
- Connolly, T., Gilmore, R. (1989) The signal recognition particle receptor mediates the GTP-dependent displacement of SRP from the signal sequence of the nascent polypeptide. *Cell* 57:599-610.
- Connolly, T., Rapiejko, P.J., Gilmore, R. (1991) Requirement of GTP Hydrolysis for dissociation of the signal recognition particle from its receptor. *Science* 252:1171-1173.
- Corsi, A.K., Schekman, R. (1996) Mechanism of polypeptide translocation into the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 271:30299-30302.
- Corsi, A.K., Schekman, R. (1997) The luminal domain of Sec63p stimulates the ATPase activity of BiP and mediates BiP recruitment to the translocon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 137: 1483-1493.
- Crowley, K.S., Reinhart, G.D., Johnson, A.E. (1993) The signal sequence moves through a ribosomal tunnel into a noncytoplasmic aqueous environment at the ER membrane early in translocation. *Cell* 73:1101-1115.
- Crowley, K.S., Liao, S., Worrell, V.E., Reinhart, G.D., Johnson, A.E. (1994) Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore. *Cell* 78:461-471.
- Derman, A.I., Puziss, J.W., Bassford, P.J., Beckwith, J. (1993) A signal sequence is not required for protein export in *prlA* mutants of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 12:879-888.
- Deshaies, R.J., Schekman, R. (1987) A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 105:633-645.
- Deshaies, R.J., Koch, B.D., Werner-Washburne, M., Craig, E.A., Schekman, R. (1988) A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature.* 332:800-805.

- Deshaies, R.J., Schekman, R. (1989) Sec62 encodes a putative membrane protein required for protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 109:2653-2664.
- Deshaies, R.J., Sanders, S.L., Feldheim, D.A., Schekman, R. (1991) Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature* 349:806-808.
- Do, H., Falcone, D., Lin, J., Andrews, D.W., Johnson, A.E. (1996) The cotranslational integration of membrane proteins into the phospholipid bilayer is a multistep process. *Cell* 85:369-378.
- Duong, F., Wickner, W. (1997) Distinct catalytic roles of the SecYE, SecG and SecDFyajC subunits of preprotein translocase holoenzyme. *EMBO J.* 16:2756-2768.
- Duong, F., Wickner, W. (1997a) The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling. *EMBO J.* 16:4871-4879.
- Duong, F., Eichler, J., Price, A., Leonard, M.R., Wickner, W. (1997) Biogenesis of the gram-negative bacterial envelope. *Cell* 91:567-573.
- Economou, A., Wickner, W. (1994) SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell* 78:835-843.
- Economou, A., Pogliano, J.A., Beckwith, J., Oliver, D., Wickner, W. (1995) SecA membrane cycling at SecYEG is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by SecD and SecF. *Cell* 83:1171-1181.
- Emr, S.D., Hanley-Way, S., Silhavy, T. (1981) Suppressor mutations that restore export of a protein with a defective signal sequence. *Cell* 23:79-88.
- Esnault, Y., Blondel, M.O., Deshaies, R.J., Schekman, R., Kepes, F. (1993) The yeast SSS1 gene is essential for secretory protein translocation and encodes a conserved protein of the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 12:4083-4093.
- Fang, H., Green, N. (1994) Nonlethal *sec71-1* and *sec72-2* mutations eliminate proteins associated with the Sec63p-BiP complex from *S.cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 5:933-942.
- Feldheim, D., Yoshimura, K., Admon, A., Schekman, R. (1993) Structural and functional characterization of Sec66p, a new subunit of the polypeptide translocation apparatus in the yeast endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* 4:931-939.
- Feldheim, D., Schekman, R. (1994) Sec72p contributes to the selective recognition of signal peptides by the secretory polypeptide translocation complex. *J. Cell Biol.* 126:935-943.
- Flower, A.M., Doebele, R.C., Silhavy, T.J. (1994) PrlA and PrlG suppressors reduce the requirement for signal sequence recognition. *J. Bacteriol.* 176:5607-5614.
- Flower, A.M., Osborne, R.S., Silhavy, T.J. (1995) The allele-specific synthetic lethality of *prlA-prlG* double mutants predicts interactive domains of SecY and SecE. *EMBO J.* 14:884-893.
- Garcia, P.D., Walter, P. (1988) Full length prepro-a-factor can be translocated across the mammalian microsomal membrane only if translocation has not terminated. *J. Cell Biol.* 106:1043-1048.
- Gierasch, L.M. (1989) Signal sequences. *Biochemistry* 28:923-930.
- Gilmore, R., Walter, P., Blobel, G. (1982) Protein translocation across the endoplasmic reticulum. II. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor. *J. Cell Biol.* 95:470-477.

- Gilmore, R., Blobel, G. (1985) Translocation of secretory proteins across the microsomal membrane occurs through an environment accessible to aqueous perturbants. *Cell* 42:497-505.
- Gilmore, R., Collins, P., Johnson, J., Kellaris, K., Rapiejeko, P. (1991) Transcription of full-length and truncated mRNA transcripts to study protein translocation across the endoplasmic reticulum. In: *Laboratory methods in vesicular and vectorial transport*, by Tartakoff, A.M., Academic Press: 19-35.
- Glick, B.S. (1995) Can Hsp70 proteins act as force-generating motors? *Cell* 80:11-14.
- Görllich, D., Prehn, S., Hartmann, E., Kalies, K.U., Rapoport, T.A. (1992) A mammalian homolog of Sec61p and SecYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell* 71:489-503.
- Görllich, D., Hartmann, E., Prehn, S., Rapoport, T. (1992a) A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation. *Nature* 357:47-52.
- Görllich, D., Rapoport, T.A. (1993) Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 75:615-630.
- Hachiya, N., Alam, R., Sakasegawa, Y., Sakaguchi, M., Mihara, K., Omura, T. (1993) A mitochondrial import factor purified from rat liver cytosol is an ATP-dependent conformational modulator for precursor proteins. *EMBO J.* 12:1579-1586.
- Hamman, B.D., Chen, J.C., Johnson, E.E., Johnson, A.E. (1997) The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane. *Cell* 89:535-544.
- Hamman, B.D., Hendershot, L.M., Johnson, A.E. (1998) BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell* 92:747-758.
- Hanada, M., Nishiyama, K., Mizushima, S., Tokuda, H. (1994) Reconstitution of an efficient protein translocation machinery comprising SecA and the three membrane proteins, SecY, SecE, and SecG (p12). *J. Biol. Chem.* 269: 23625-23631.
- Hann, B.C., Walter, P. (1991) The signal sequence recognition particle in *S.cerevisiae*. *Cell.* 67:131-144.
- Hansen, W., Garcia, P.D., Walter, P. (1986) In vitro protein translocation across the yeast endoplasmic reticulum: ATP-dependent posttranslational translocation of the prepro-a-factor. *Cell.* 45:397-406.
- Hansen, W., Walter, P. (1988) Prepro-Carboxypeptidase Y and a truncated form of pre-invertase, but not full-length pre-invertase, can be posttranslationally translocated across microsomal vesicle membranes from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 106:1075-1081.
- Hartl, F.U., Lecker, S., Schiebel, E., Hendrick, J.P., Wickner, W. (1990) The binding cascade of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the E.coli plasma membrane. *Cell* 63:269-279.
- Hartmann, E., Sommer, T., Prehn, S., Görllich, D., Jentsch, S., Rapoport, T.A. (1994) Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. *Nature* 367:654-657.
- Hedge, R.S., Lingappa, V.R. (1996) Sequence-specific alteration of the ribosome-membrane junction exposes nascent secretory proteins to the cytosol. *Cell* 85:217-228.
- Hedge, R.S., Voigt, S., Rapoport, T.A., Lingappa, V.R. (1998) TRAM regulates the exposure of nascent secretory proteins to the cytosol during translocation into the endoplasmic reticulum. *Cell* 92:621-631.

- Hendrick, J.P., Wickner, W. (1991) SecA protein needs both acidic phospholipids and SecY/E protein for functional, high-affinity binding to the E.coli plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 266:24596-24600.
- High, S., Dobberstein, B. (1991) The signal sequence interacts with the methionine-rich domain of the 54-kD protein of signal recognition particle. *J. Cell Biol.* 113:229-233.
- High, S., Martoglio, B., Görlich, D., Andersen, S.S.L., Ashford, A.J., Giner, A., Hartmann, E., Prehn, S., Rapoport, T.A., Dobberstein, B., Brunner, J. (1993) Site-specific photocrosslinking reveals that Sec61p and TRAM contact different regions of a membran-inserted signal sequence. *J. Biol. Chem.* 268:26745-26751.
- Ito, K. (1995) Protein translocation genetics. *Adv. Cell Mol. Biol. Membranes Organelles* 4:35-60.
- Johnson, A.E., Woodward, W.R., Herbert, E., Menninger, J.R. (1976) N<sup>ε</sup>-acetyllysine transfer ribonucleic acid: A biologically active analog of aminoacyl transfer ribonucleic acids. *Biochemistry* 15:569-575.
- Joly, J.C., Wickner, W. (1993) The SecA and SecY subunits of translocase are the nearest neighbors of a translocating preprotein, shielding it from phospholipids. *EMBO J.* 12:255-263.
- Jungnickel, B., Rapoport, T.A. (1995). A posttargeting signal sequence recognition event in the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 82:261-270.
- Kalies, K.U., Görlich, D., Rapoport, T.A. (1994) Binding of ribosomes to the rough endoplasmic reticulum mediated by the Sec61p-complex. *J. Cell Biol.* 126:925-934.
- Kalies, K.U., Rapoport, T.A., Hartmann, E. (1998) The  $\beta$  subunit of the Sec61 complex facilitates cotranslational protein transport and interacts with the signal peptidase during translocation. *J. Cell Biol.* 141:887-894.
- Keenan, R.J., Freymann, D.M., Walter, P., Stroud, R.M. (1998) Crystal Structure of the signal sequence binding subunit of the signal recognition particle. *Cell* 94:181-191.
- Killian, J.A., deJong, A., Bijvelt, J., Verkleij, A.J., deKruijff, B. (1990) Induction of non-bilayer lipid structures by functional signal peptides. *EMBO J.* 9:815-819.
- Kim, Y.J., Rajapandi, T., Oliver, D. (1994) SecA protein is exposed to the periplasmic surface of the E.coli inner membrane in its active state. *Cell* 78:845-853.
- Krieg, U.C., Walter, P., Johnson, A.E. (1986) Photocrosslinking of the signal sequence of nascent preprolactin to the 54-kilodalton polypeptide of the signal recognition particle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:8604-8608.
- Kurihara, T., Silver, P. (1993) Suppression of a sec63 mutation identifies a novel component of the yeast endoplasmic reticulum translocation apparatus. *Mol. Biol. Cell* 4:919-930.
- Kurzchalia, T.V., Wiedmann, M., Girshovich, A.S., Bochkareva, E.S., Bielka, H., Rapoport, T.A. (1986) The signal sequence of nascent preprolactin interacts with the 54K polypeptide of the signal recognition particle. *Nature.* 320:634-636.
- Liao, S., Lin, J., Do, H., Johnson, A.E. (1997) Both lumenal and cytosolic gating of the aqueous ER translocon pore are regulated from inside the ribosome during membrane protein integration. *Cell* 90:31-41.



- Lill, R., Dowhan, W., Wickner, W. (1990) The ATPase activity of SecA is regulated by acidic phospholipids, SecY, and the leader and mature domains of precursor proteins. *Cell* 60:259-269.
- Lütcke, H., High, S., Römisch, K., Ashford, A.J., Dobberstein, B. (1992) The methionine-rich domain of the 54 kDa subunit of signal recognition particle is sufficient for the interaction with signal sequences. *EMBO J.* 11:1543-1551.
- Lyko, F., Martoglio, B., Jungnickel, B., Rapoport, T.A., Dobberstein, B. (1995) Signal sequence processing in rough microsomes. *J. Biol. Chem.* 270:19873-19878.
- Lyman, S.K., Schekman, R. (1995) Interaction between BiP and Sec63p is required for completion of protein translocation into the ER of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 131:1163-1171.
- Lyman, S.K., Schekman, R. (1997) Binding of secretory precursor polypeptides to a translocon subcomplex is regulated by BiP. *Cell* 88:85-96.
- Martoglio, B., Hofmann, M.W., Brunner, J., Dobberstein, B. (1995) The protein-conducting channel in the membrane of the endoplasmic reticulum is open laterally toward the lipid bilayer. *Cell* 81:207-214.
- Martoglio, B., Graf, R., Dobberstein, B. (1997) Signal peptide fragments of prolactin and HIV-1 p-gp160 interact with calmodulin. *EMBO J.* 16:6636-6645.
- Martoglio, B., Dobberstein, B. (1998) Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol.* 8:410-415.
- Matlack, K.E.S., Walter, P. (1995) The 70 carboxyl-terminal amino acids of nascent secretory proteins are protected from proteolysis by the ribosome and the protein translocation apparatus of the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* 270:6170-6180.
- Matlack, K.E.S., Plath, K., Misselwitz, B., Rapoport, T.A. (1997) Protein transport by purified yeast Sec complex and Kar2p without membranes. *Science* 277:938-941.
- Matlack, K.E.S., Misselwitz, B., Plath, K., Rapoport, T.A. (1999) BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-a-factor across the ER membrane. *Cell*, in press.
- Meyer, D.I., Krause, E., Dobberstein, B. (1982) Secretory protein translocation across membranes- the role of the docking protein. *Nature* 297:647-650.
- Meyer, T., Menetret, J.F., Breitling, R., Miller, K.R., Akey, C.W., Rapoport, T.A. (1999) The bacterial SecY/E translocation complex forms channel-like structures similar to those of the eukaryotic Sec61p complex. *J. Mol. Biol.* 285:1789-1800.
- Miller, J. D., Tajima, S., Lauffer, S., Walter, P. (1995) The  $\beta$ -subunit of the signal recognition particle receptor is a transmembrane GTPase that anchors the  $\alpha$  subunit, a peripheral membrane GTPase, to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 128:273-282.
- Millmann, J. S., Andrews, D. W. (1997) Switching the model: A converted mechanism for GTPases in protein targeting. *Cell*. 89:673-676.
- Misselwitz, B., Staack, O., Rapoport, T.A. (1998) J proteins catalytically activate Hsp70 molecules to trap a wide range of peptide sequences. *Mol. Cell* 2:593-603.
- Mothes, W., Prehn, S., Rapoport, T.A. (1994) Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER-membrane. *EMBO J.* 13:3973-3982.

- Mothes, W., Heinrich, S.U., Graf, R., Nilsson, I., von Heinje, G., Brunner, J., Rapoport, T.A. (1997) Molecular mechanism of membrane protein integration into the endoplasmic reticulum. *Cell* 89:523-533.
- Mothes, W., Jungnickel, B., Brunner, J., Rapoport, T.A. (1998). Signal sequence recognition in cotranslational translocation by protein components of the endoplasmic reticulum membrane. *J. Cell Biol.* 142:355-364.
- Müller, G., Zimmermann, R. (1988) Import of honeybee prepromelittin into the endoplasmic reticulum: energy requirements for membrane insertion. *EMBO J.* 7:639-648.
- Murphy, C.K., Beckwith, J. (1994) Residues essential for the function of SecE, a membrane component of the *Escherichia coli* secretion apparatus, are located in a conserved cytoplasmic region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2557-2561.
- Müsch, A. Wiedmann, M., Rapoport, T.A. (1992) Yeast Sec proteins interact with polypeptides traversing the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 69:343-352.
- Neuhof, A., Rolls, M.M., Jungnickel, B., Kalies, K.U., Rapoport, T.A. (1998) Binding of signal recognition particle gives ribosome/nascent chain complexes a competitive advantage in endoplasmic reticulum membrane interaction. *Mol. Biol. Cell* 9:103-115.
- Ng, D.T.W., Brown, J.D., Walter, P. (1996) Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J. Cell Biol.* 134:269-278.
- Nishiyama K., Mizushima S., Tokuda, H. (1993) A novel membrane protein involved in protein translocation across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 12:3409-3415.
- Nishiyama, K., Hanada, M., Tokuda, H. (1994) Disruption of the gene encoding p12 (SecG) reveals the direct involvement and important function of SecG in the protein translocation of *Escherichia coli* at low temperature. *EMBO J.* 13: 3272-3277.
- Noel, P.J., Cartwright, I.L., (1994) A Sec62p-related component of the secretory protein translocon from *Drosophila* displays developmentally complex behavior. *EMBO J.* 13:5253-5261.
- Normington, K., Kohno, K., Kozutsumi, Y., Gething, M.J., Sambrook, J. (1986) *S. cerevisiae* encodes an essential protein homologous in sequence and function to mammalian BiP. *Cell* 57: 1223-1236.
- Ogg, S.C., Poritz, M.A., Walter, P. (1992) Signal sequence recognition particle receptor is important for cell growth and protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 3:895-911.
- Ogg, S.C., Walter, P. (1995) SRP samples nascent chains for the presence of signal sequences by interacting with ribosomes at a discrete step during translation elongation. *Cell.* 81:1075-1084.
- Osborne R.S., Silhavy, T.J. (1993) PrlA suppressor mutations cluster in regions corresponding to three distinct topological domains. *EMBO J.* 12:3391-3398.
- Palade, G. (1975) Intracellular aspects of the process of protein secretion. *Science* 189: 347-358.
- Panzner, S, Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S., Rapoport, T.A. (1995) Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell.* 81:561-570.
- Phillips, G.J., Silhavy, T.J. (1992) The *E.coli ffh* gene is necessary for viability and efficient protein export. *Nature* 359:744-746.

- Pohlschröder, M., Murphy, C., Beckwith, J. (1996) *In vivo* analyses of interactions between SecE and SecY, core components of the *Escherichia coli* protein translocation machinery. J. Biol. Chem. 271:19908-19914.
- Poritz, M.A., Strub, K., Walter, P. (1988) Human SRP RNA and E.coli 4.5S RNA contain a highly homologous structural domain. Cell 55:4-6.
- Powers, T., Walter, P. (1995) Reciprocal stimulation of GTP hydrolysis by two directly interacting GTPases. Science 269:1422-1424.
- Prinz, W.A., Spiess, C., Ehrmann, M., Schierle, C., Beckwith, J. (1996) Targeting of signal sequenceless proteins for export in *Escherichia coli* with altered protein translocase. EMBO J. 15:5209-5217.
- Raden, D., Gilmore, R. (1998) Signal recognition particle-dependent targeting of ribosomes to the rough endoplasmic reticulum in the absence and presence of the nascent polypeptide-associated complex. Mol. Biol. Cell 8:117-130.
- Randall, L.L., Topping, T.B., Hardy, S.J. (1990) No specific recognition of leader peptide by SecB, a chaperone involved in protein export. Science 248:860-863.
- Rapiejko, P.J., Gilmore, R. (1997) Empty site forms of the SRP54 and SR $\alpha$  GTPases mediate targeting of ribosome-nascent chain complexes to the endoplasmic reticulum. Cell. 89:703-713.
- Rapoport, T.A., Junnickel, B., Kutay, U. (1996) Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. Annu. Rev. Biochem. 65:271-303.
- Römisch, K., Webb, J., Herz, J., Prehn, S., Frank, R., Vingron, M., Dobberstein, B. (1989) Homology of the 54K protein of signal recognition particle, docking protein, and two E.coli proteins with putative GTP-binding domains. Nature 340:478-482.
- Rothblatt, J.A., Meyer, D.I. (1986) Secretion in yeast: translocation and glycosylation of prepro- $\alpha$ -factor *in vitro* can occur via an ATP-dependent post-translational mechanism. EMBO J. 5:1031-1036.
- Rothblatt J.A., Deshaies, R.J., Sanders, S.L., Daum, G., Schekman, R. (1989) Multiple Genes are required for proper insertion of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in yeast. J. Cell Biol. 109:2641-2652.
- Sadler, I., Chiang, A., Kurihara, T., Rothblatt, J., Way, J., Silver, P. (1989) A yeast gene important for protein assembly into the endoplasmic reticulum and the nucleus has homology to DnaJ, an *Escherichia coli* heat shock protein. J. Cell Biol. 109:2665-2675.
- Sako, T. (1991) Novel *prfA* Alleles defective in supporting staphylokinase processing in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 173:2289-2296.
- Sanders, S.L., Whitfield, K.M., Vogel, J.P., Rose, M.D., Schekman, R.W. (1992) Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER. Cell 69:353-365.
- Sanz, P., Meyer, D.I. (1989) Secretion in yeast: preprotein binding to a membrane receptor and ATP dependent translocation are sequential and separable events *in vitro*. J. Cell Biol. 108:2101-2106.
- Schatz, P.J., Riggs, P.D., Jacq, A., Fath, M.J., Beckwith, J. (1989) The *secE* gene encodes an integral membrane protein required for protein export in *Escherichia coli*. Genes Dev. 3:1035-1044.
- Schatz, P.J., Bieker, K.L., Ottemann, K.M., Silhavy, T.J., Beckwith, J. (1991) One of three transmembrane stretches is sufficient for the functioning of the SecE protein, a membrane component of the *E.coli* secretion machinery. EMBO J. 10:1749-1757.

- Schiebel, E., Driessen, A.J.M., Hartl, F.U., Wickner, W. (1991)  $\Delta\mu_{H^+}$  and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase. *Cell* 64:927-939.
- Schlenstedt, G. Zimmermann, R. (1987) Import of frog prepropeptide GLa into microsomes requires ATP but does not involve docking protein or ribosomes. *EMBO J.* 6:699-703.
- Schneider, H.C., Berthold, J., Bauer, M.F., Dietmeier, K., Guiard, B., Brunner, M., Neupert, W. (1994) Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature* 371:768-774.
- Scidmore, M.A., Okamura H.H., Rose, M.D. (1993) Genetic interactions between *KAR2* und *SEC63*, encoding eukaryotic homologues of DnaK and DnaJ in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell.* 4:1145-1159.
- Shaw, A.S., Rottier, P.J.M., Rose, J.K. (1988) Evidence for the loop model of signal-sequence insertion into the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7592-7596.
- Shimoike, T., Akiyama, Y., Baba, T., Taura, T., Ito, K. (1992) SecY variants thta interfere with *Escherichia coli* protein export in the presence of normal secY. *Mol. Microbiol.* 6:1205-1210.
- Siegel, V., Walter, P. (1986) Removal of the Alu structural domain from signal recognition particle leaves its protein translocation activity intact. *Nature* 320:81-84.
- Siegel, V., Walter, P. (1988) The affinity of signal recognition particle for presecretory proteins is dependent on nascent chain length. *EMBO J.* 7:1769-1775.
- Simon, S.M., Blobel, G. (1991) A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell* 65:371-380.
- Simon, S.M., Blobel, G. (1992) Signal peptides open protein-conducting channels in E.coli. *Cell* 69:677-684.
- Simon, S.M., Peskin, C.S., Oster, G.F. (1992) What drives the translocation of proteins? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3770-3774.
- Stader, J., Gansheroff, L.J., Silhavy, T.J. (1989) New suppressors of signal-sequence mutations, *prlG*, are linked tightly to the *secE* gene of *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 3:1045-1052.
- Stirling, C.J., Rothblatt, J., Hosobuchi, M., Deshaies, R., Schekman, R. (1992) Protein translocation mutants defective in the insertion of integral membrane proteins into the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* 3:129-142.
- Stirling, C.J., Hewitt, E.W. (1992) The *S. cerevisiae SEC65* gene encodes a component of yeast signal recognition particle with homology to human SRP19. *Nature.* 356:534-537.
- Struck, J.C.R., Toschka, H.Y., Specht, T., Erdmann, V.A. (1988) Common structural features between eukaryotic 7SL RNAs, eubacterial 4.5S RNS and scRNA and archaeobacterial 7SRNA. *Nucleic Acids Res.* 16:7740.
- Toikkanen, J., Gatti, E., Takei, K., Saloheimo, M., Olkkonen, V.M., Söderlund, H., DeCamilli, P., Keränen, S. (1996) Yeast protein translocation complex: Isolation of two genes SEB1 and SEB2 encoding proteins homologous to the Sec61 $\beta$  subunit. *Yeast* 12:425-438.
- Ulbrandt, N.D., Newitt, J.A., Bernstein, H.D. (1997) The *E.coli* signal recognition particle is required for the insertion of a subset of inner membrane proteins. *Cell* 88:187-196.

- van der Wolk, J.P.W., Fekkes, P., Boorsma, A., Huie, J.L., Silhavy, T.J., Driessen, A.J.M. (1998) PrlA4 prevents the rejection of signal sequence defective preproteins by stabilizing the SecA-SecY interaction during the initiation of translocation. *EMBO J.* 17:3631-3639.
- Vogel, J.P., Misra, L.M., Rose, M.D. (1990) Loss of BiP/GRP78 function blocks translocation of secretory proteins in yeast. *J. Cell Biol.* 110:1885-1895.
- Voigt, S., Jungnickel, B., Hartmann, E., Rapoport, T.A. (1996) Signal sequence-dependent function of the TRAM protein during early phases of protein transport across the Endoplasmic reticulum membrane. *J. Cell. Biol.* 134:25-35.
- von Heijne, G. (1985) Signal sequences. The limits of variation *J. Mol. Biol.* 184:99-105.
- von Heijne, G. (1998) Life and death of a signal peptide. *Nature* 396:111-113.
- Walter, P., Blobel, G. (1980) Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA.* 77:7112-7116.
- Walter, P., Blobel, G. (1981) Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J. Cell Biol.* 91:545-561.
- Walter, P., Ibrahimi, I., Blobel, G. (1981) Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in vitro assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J. Cell Biol.* 91:545-550.
- Walter, P., Blobel, G. (1982) Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature.* 299:691-698.
- Walter, P., Johnson, A.E. (1994) Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10:87-119.
- Waters, M.G., Blobel, G. (1986) Secretory protein translocation in a yeast cell-free system can occur posttranslationally and requires ATP hydrolysis. *J. Cell Biol.* 102:1543-1550.
- Waters, M.G., Chirico, W.J., Blobel, G. (1986) Protein translocation across the yeast microsomal membrane is stimulated by a soluble factor. *J. Cell Biol.* 103:2629-2636.
- Wiedmann, M., Kurzchalia, T.V., Bielka, H., Rapoport, T.A. (1987) Direct probing of the interaction between the signal sequence of nascent preprolactin and the signal recognition particle by specific crosslinking. *J. Cell Biol.* 104: 201-208.
- Wilkinson, B.M., Critchley, A.J., Stirling, C.J. (1996) Determination of the transmembrane topology of yeast Sec61p, an essential component of the endoplasmic reticulum translocation complex. *J. Biol. Chem.* 271:25590-25597.
- Wilkinson, B.M., Esnault, Y., Craven, R.A., Skiba, F., Fieschi, J., Kepes, F., Stirling, C.J. (1997) Molecular architecture of the ER translocase probed by chemical crosslinking of Sss1p to complementary fragments of Sec61p. *EMBO J.* 16:4549-4559.
- Zheng, N., Gierasch, L.M. (1996) Signal sequences: the same yet different. *Cell* 86:849-852.
- Zopf, D., Bernstein, H.D., Johnson, A.E., Walter, P. (1990) The methionine-rich domain of the 54 kd protein subunit of the signal recognition particle contains an RNA binding site and can be crosslinked to a signal sequence. *EMBO J.* 9:4511-4517.

## 5. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Å	Ångström
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ConA	Concanavalin A
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
Hsp70	Hitzeschockprotein mit einem Molekulargewicht von 70 Kilodalton
I P	Immunopräzipitation
kD	Kilodalton
mRNA	"messenger RNA"
NAC	"nascent polypeptide associated complex"
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid
NEM	N-Ethylmaleimid
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
Pos.	Position
ppαF	Prepro-Alphafaktor
prl	für protein localization, Mutanten in <i>E.coli</i> , die die Sekretion von Proteinen mit defekten Signalsequenzen erlauben
RAMPs	"ribosome-associated membrane proteins"
RNA	Ribonukleinsäure
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SR	SRP-Rezeptor
SRP	Signalsequenz-Erkennungspartikel, engl. "signal recognition particle"
TCA	Trichloressigsäure
Tcp1	"t-complex polypeptide 1"
TM	Transmembrandomäne
TRAM	"translocating chain-associating membrane protein" (engl.)
TRiC	"t-complex polypeptide 1 ring complex"
tRNA	"transfer-RNA"
UV	ultravioletter Lichtbereich
wt	Wildtyp

## 6. ANHANG

### EIGENANTEIL AN DEN VORGESTELLTEN ARBEITEN

**Anlage 1,** Hanein, D., Matlack, K.E., Jungnickel, B., Plath, K., Kalies, K.U., Miller, K.R., Rapoport, T.A., Akey, C.W. (1996). Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. *Cell* 87:721-732.

- Reinigung des Sec61p-Komplexes und des Sec-Komplexes aus ER-Membranen der Hefe
- Dissoziation des Sec-Komplexes in seine Teilkomplexe und deren anschließende Aufreinigung
- Isolation von Ribosomen aus dem Cytosol von Hefen
- Rekonstitution der Proteinkomplexe in Proteoliposomen und Ribosomenbindung

**Anlage 2,** Finke, K. \*, Plath, K. \*, Panzner, S., Prehn, S., Rapoport, T.A., Hartmann, E., Sommer, T. (1996). A second trimeric complex containing homologs of the Sec61p complex functions in protein transport across the ER membrane of *S. cerevisiae*. *EMBO J.* 15:1482-1494. (\*both authors contributed equally to this work)

- *in vitro* Translokationsassays mit ER-Membranen der  $\Delta sbh1$ -,  $\Delta sbh2$ - und  $\Delta sbh1/\Delta sbh2$ -Deletionsmutanten und dem posttranslationalen Translokationssubstrat Prepro-Alphafaktor
- Akkumulation von Translokationssubstraten im Cytosol der  $\Delta sbh1$ -,  $\Delta sbh2$ - und  $\Delta sbh1/\Delta sbh2$ -Deletionsmutanten
- Reinigung des Ssh1p-Komplexes aus dem Digitoninextrakt und der RAMP-Fraktion sowie Coimmunopräzipitationsexperimente mit gegen Sec61p, Sbh1p, Sss1p, Ssh1p, Sbh2p, Sec62p, Sec71p und Sec72p gerichteten Antikörpern
- Reinigung des Ssh1p-Komplexes und des Sec61p-Komplexes aus dem Digitoninextrakt von ER-Membranen der  $\Delta sbh1$ -,  $\Delta sbh2$ -,  $\Delta sbh1/\Delta sbh2$ - und  $\Delta ssh1/\Delta sbh1$ -Deletionsmutanten und Coimmunopräzipitationsexperimente

**Anlage 3,** Plath, K., Mothes, W., Wilkinson, B.M., Stirling, C.J., Rapoport, T.A. (1998). Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane. *Cell* 94:795-807.

- alle gezeigten Experimente, bis auf die von Dr. Walter Mothes stammenden, in Abbildung 3F und 4D gezeigten Quantifizierungen zur Signalsequenzerkennung im cotranslationalen Säugersystem, sind von mir durchgeführt worden
- Dr. Josef Brunner stellte die Quervernetzungsreagenzien und Dr. Barrie Wilkinson und Dr.

Colin Stirling die Sec61p-Hefemutanten zur Verfügung; die Stopcodon enthaltenden Prepro-  
Alphafaktor-Mutanten wurden gemeinsam mit Dr. Walther Mothes hergestellt

**Anlage 4,** Das Sec61p-Oligomer bindet an den Austrittsort der naszierenden Kette am  
Ribosom

- Reinigung des Sec61p-Komplexes aus dem Digitoninextrakt von ER-Membranen der Hefe
- Etablierung einer Methode, die die spezifische und effiziente Bindung des Sec61p-Komplexes an Ribosomen, die Entfernung ungebundener Sec61p-Komplexe und freier Ribosomen und die anschließende Analyse der Probe mit Kryo-Elektronenmikroskopie erlaubt
- die Elektronenmikroskopie und Ermittlung der dreidimensionalen Struktur des Ribosom-Sec61p-Komplexes wurde von Dr. Jean Francois Menetret, Dr. David Morgan und Dr. Chris Akey (Boston-University) durchgeführt

**Anlage 5,** Die cytosolischen Interaktionspartner des Prepro-Alphafaktors werden bei  
seiner Bindung an den Sec-Komplex freigesetzt

- alle gezeigten Experimente sind von mir durchgeführt worden
- Dr. Josef Brunner (ETH Zürich) stellte das Quervernetzungsreagenz zur Verfügung

Dr. Tom Rapoport hat an allen Arbeiten einen wesentlichen Anteil, besonders bei der Auswahl der Projekte, bei der Fokussierung auf entscheidende Fragestellungen und dem Schreiben der Veröffentlichungen.



## **ERKLÄRUNG**

Ich erkläre, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Kathrin Plath

Boston, den 10.Mai 1999

**LEBENS LAUF, KATHRIN PLATH**

geboren am 2. Mai 1971 in Brandenburg/Havel, ledig  
deutsche Staatsangehörigkeit

Aug. 1989	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife (Abitur) in Brandenburg
Sept.1989 - Aug. 1990	Studium der Synthesechemie an der Humboldt-Universität zu Berlin
Sept.1990 - Juni 1994	Studium der Biochemie an der Humboldt-Universität zu Berlin
Juni 1994	Hochschulabschluß als Diplombiochemikerin Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Matthias Gaestel am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin zum Thema: "Untersuchungen zur Funktion und Struktur der MAP-Kinase aktivierten Proteinkinase 2"
Juli 1994 - Okt.1994	Praktikum im Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism bei der Pharmaceutical Division der Bayer Corporation, West Haven, USA
Nov.1994 - Feb.1995	Fortsetzung der im Diplom begonnen wissenschaftlichen Arbeiten in der Arbeitsgruppe von Prof. M. Gaestel
März 1995 - Aug.1995	Beginn der vorliegenden Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Tom Rapoport am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin
seit Sept. 1995	Fortführung der Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Tom Rapoport im Department of Cell Biology, Harvard Medical School, Boston, USA (März 95 - Dez. 1998, Stipendiat des Max-Delbrück Centrums in Berlin)

**VERÖFFENTLICHUNGEN**

Engel, K., **Plath, K.**, Gaestel, M. (1993). The MAP kinase-activated protein kinase 2 contains a proline-rich SH3-binding domain. *FEBS Lett.* 336:143-147.

**Plath, K.**, Engel, K., Schwedersky, G., Gaestel, M. (1994). Characterization of the proline-rich region of mouse MAPKAP kinase 2: influence on catalytic properties and binding to the c-abl SH3 domain in vitro. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 203:1188-1194.

Engel, K., Schultz, H., Martin, F., Kotlyarov, A., **Plath, K.**, Hahn, M., Heinemann, U., Gaestel, M. (1995). Constitutive activation of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 by mutation of phosphorylation sites and an A-helix motif. *J. Biol. Chem.* 270:27213-27221.

Finke, K.\*, **Plath, K.\***, Panzner, S., Prehn, S., Rapoport, T.A., Hartmann, E., Sommer, T. (1996). A second trimeric complex containing homologs of the Sec61p complex functions in protein transport across the ER membrane of *S. cerevisiae*. *EMBO J.* 15:1482-1494. (\*both authors contributed equally to this work)

Hanein, D., Matlack, K.E., Jungnickel, B., **Plath, K.**, Kalies, K.U., Miller, K.R., Rapoport, T.A., Akey, C.W. (1996). Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. *Cell* 87:721-732.

Matlack, K.E., **Plath, K.**, Misselwitz, B., Rapoport, T.A. (1997). Protein transport by purified yeast Sec complex and Kar2p without membranes. *Science* 277:938-941.

**Plath, K.**, Mothes, W., Wilkinson, B.M., Stirling, C.J., Rapoport, T.A. (1998). Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane. *Cell* 94:795-807.

Matlack, K.E.S., Misselwitz, B., **Plath, K.**, Rapoport, T.A. (1999) BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro- $\alpha$ -factor across the ER membrane. *Cell*, in press.

## **DANKSAGUNG**

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Rapoport, Hartmann und Sommer bedanken.

Besonders danke ich Tom Rapoport für die freundschaftliche und lehrreiche Zusammenarbeit.

Mein herzlicher Dank gilt Brigitte Nentwig, Angelika Wittstruck, Donna Lizotte, Lara Sutherland, Linda Barenboim und Carol Sawyer für die vielen großen und kleinen Hilfen im Laboralltag.

Steffen Panzner danke ich zutiefst für die Hilfestellungen und zahlreichen Ratschläge am Beginn meiner Doktorandenzeit.

Kerstin Finke, Mary Dabrowski, Enno Hartmann und Thomas Sommer danke ich für die sehr angenehme Zusammenarbeit in Berlin.

Andrea Neuhof, Ben Misselwitz, Walther Mothes und Lars Dreier danke ich für offene Gespräche und die vielen kleinen und großen Hilfen im Auf und Ab der Jahre in Boston.

## **7. ANLAGEN**

## **Anlage 4: Das Sec61p-Oligomer bindet an den Austrittsort der naszierenden Kette am Ribosom**

### **Abbildung 1: Ribosomen binden spezifisch an den Sec61p-Komplex in Membranen**

Um die dreidimensionale Struktur des Ribosom-Sec61p-Komplexes ermitteln zu können, mußte gesichert werden, daß die Sec61p-Bindungsstellen aller Ribosomen in der für die Elektronenmikroskopie bereitgestellten Probe gesättigt sind und gleichzeitig kaum ungebundener Sec61p-Komplex in dieser Probe enthalten ist. In die Bildverarbeitung eingehende Bilder freier Ribosomen führen zu einem dreidimensionalen Bild des Ribosom-Sec61p-Komplexes, in dem die Intensität des Sec61p-Komplexes deutlich schwächer ist als die des Ribosoms. Freie Ribosomen können jedoch im Elektronenmikroskop nicht von Ribosom-Sec61p-Komplexen unterschieden werden (siehe Abbildung 2). Der gleichmäßig an den elektronenmikroskopischen Träger bindende freie Sec61p-Komplex stört die Auswertung ebenfalls, da die Ribosomen nicht klar vom Hintergrund abgrenzbar sind. Um die beiden Bedingungen zu erfüllen, wurden gereinigte Ribosomen der Hefe (Bahn 1 des Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgels) unter physiologischen Salzkonzentrationen mit Proteoliposomen inkubiert, die den Sec61p-Komplex enthalten (in Bahn 2 mit Vierecken markiert), und nicht einfacherweise mit dem Sec61p-Komplex in Detergenzlösung. Die im SDS-Gel sichtbaren Verunreinigungen der Sec61p-Komplex-Präparation werden nicht in Proteoliposomen integriert. Durch die Flotation der Membranen in einem diskontinuierlichen Dichtegradienten konnten die an die Vesikel gebundenen Ribosomen isoliert werden (Bahn 3). In diesem Schritt sedimentieren ungebundene Ribosomen (Bahnen 5 und 7). Die Bindung der Ribosomen an die Proteoliposomen erfolgt spezifisch über eine Interaktion mit dem Sec61p-Komplex, da die Ribosomen nicht mit Liposomen flotierbar sind (vergleiche Bahnen 4, 6 und 8 mit Bahnen 3, 5 und 7). Die Lipidmoleküle der flotierten Vesikel in den Bahnen 3 und 4 sind durch Sterne gekennzeichnet. Nachdem die flotierten Vesikel mit Digitonin solubilisiert wurden, konnten die Ribosom-Sec61p-Komplexe durch Sedimentation von den freien Sec61p-Komplexen abgetrennt und in einem Digitonin-haltigen Puffer elektronenmikroskopisch analysiert werden (siehe Abbildungen 2 und 3).

## **Abbildung 2: Kryo-elektronenmikroskopische Aufnahme der Ribosom-Sec61p-Komplexe in Detergenzlösung**

Die auf ein mit einer Kohlenstoffschicht überzogenes Trägernetz aufgebrachte Probe wurde sehr schnell durch Eintauchen in flüssiges Ethan bei einer Temperatur von  $-196^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die elektronenmikroskopische Aufnahme der tiefgefrorenen Probe zeigt die Ribosomen-Sec61p-Komplexe in vielen verschiedenen Orientierungen. Einige Beispiele sind durch die Pfeile hervorgehoben.

## **Abbildung 3: Die dreidimensionale Rekonstruktion des Ribosom-Sec61p-Komplexes**

Bilder von 6000 Ribosom-Sec61p-Komplexen wurden digitalisiert und durch verschiedene Bildverarbeitungsverfahren so zusammengestellt, daß ein dreidimensionales Bild des Komplexes mit einer Auflösung von ungefähr  $30\text{\AA}$  entsteht. Die Seitenansicht (A) zeigt, daß sich der oligomere Sec61p-Komplex in einem Abstand von  $15\text{-}20\text{\AA}$  zur großen Untereinheit des Ribosoms befindet. Das Sec61p-Oligomer ist nur über eine einzige Ausstülpung (Pfeil) mit dem Ribosom verbunden. Das Sec61p-Oligomer könnte von vier heterotrimeren, möglicherweise unterschiedlich ausgerichteten Sec61p-Komplexen gebildet werden, da die vom Ribosom weggewandte Oberfläche des Sec61p-Zylinders (in B) deutlich vier Massenschwerpunkte aufweist, deren Positionen in dem Einsatz durch Punkte gekennzeichnet sind. In einer Serie von  $5\text{\AA}$  dicken Schnitten durch den Ribosom-Sec61p-Komplex (C) wird ein ribosomaler Tunnel sichtbar, der genau in den Mittelpunkt des oligomeren Sec61p-Komplexes mündet und wahrscheinlich dem Kanal entspricht, durch den naszierende Polypeptidketten das Ribosom verlassen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß die naszierende Kette direkt vom Peptidyltransferase-Zentrum im Ribosom durch die oligomere Struktur des Sec61p-Komplexes in das Lumen des ER geleitet werden kann. Der angenommene Weg der naszierenden Kette ist durch eine gestrichelte Linie in Schnitt 4 gekennzeichnet. Eine kürzlich erhaltene verbesserte dreidimensionale Struktur des Ribosom-Sec61p-Komplexes mit einer Auflösung von ungefähr  $25\text{\AA}$ , in die die Information von 10000 einzelnen Partikel einging, zeigt das Sec61p-Oligomer mit einer zentralen Pore, die sich durch das gesamte Partikel erstreckt (nicht gezeigte Daten).

**Abbildung 4: Kryo-elektronenmikroskopische Aufnahmen von einzelnen Ribosomen, die an den Sec61p-Komplex in Membranen gebunden sind**

Um herauszufinden, ob die deutliche Trennung zwischen dem Ribosom und dem oligomeren Sec61p-Komplex durch die Solubilisierung des Komplexes in Digitonin hervorgerufen wurde, untersuchten wir den Ribosom-Sec61p-Komplex auch direkt in Membranen. Dazu wurden Ribosomen (Klammer) mit Proteoliposomen (Pfeil) inkubiert, die den gereinigten Sec61p-Komplex enthalten, die Vesikel flotiert und anschließend durch die Kryo-Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht. Eine dreidimensionale Rekonstruktion zeigt, daß das Ribosom mindestens 15Å von der Membranoberfläche entfernt sein muß (nicht gezeigte Ergebnisse).



Abbildung 1

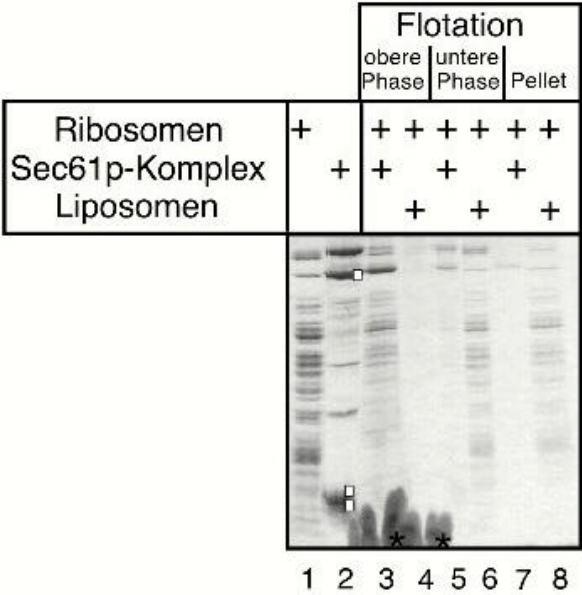


Abbildung 2

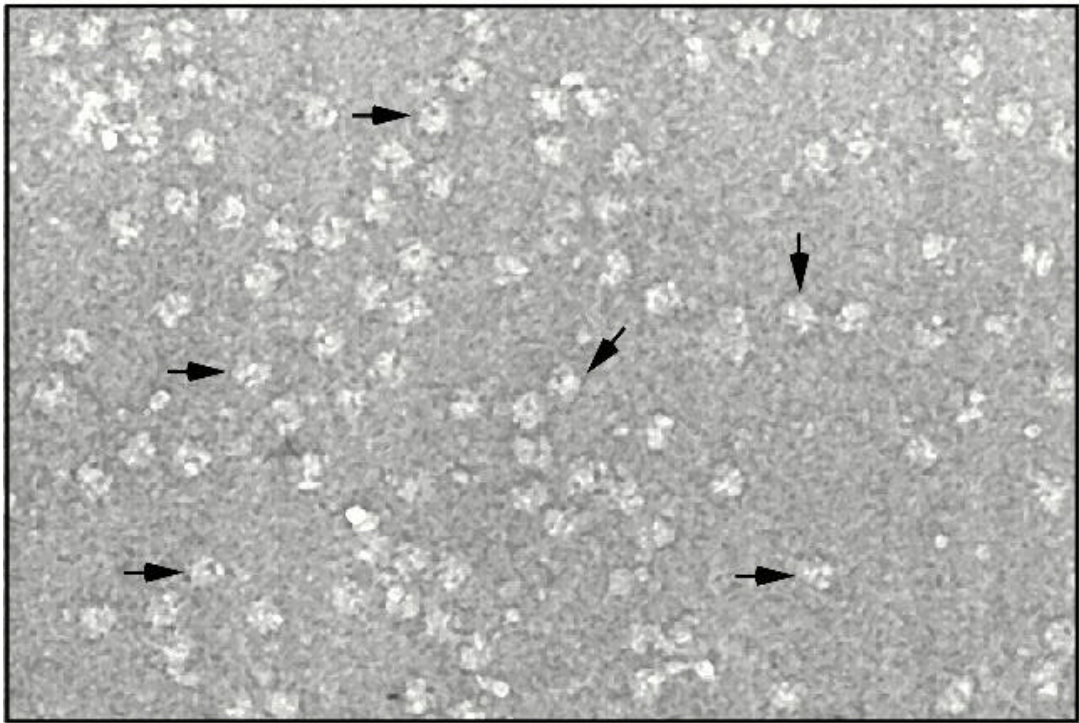


Abbildung 3

Anlage 4

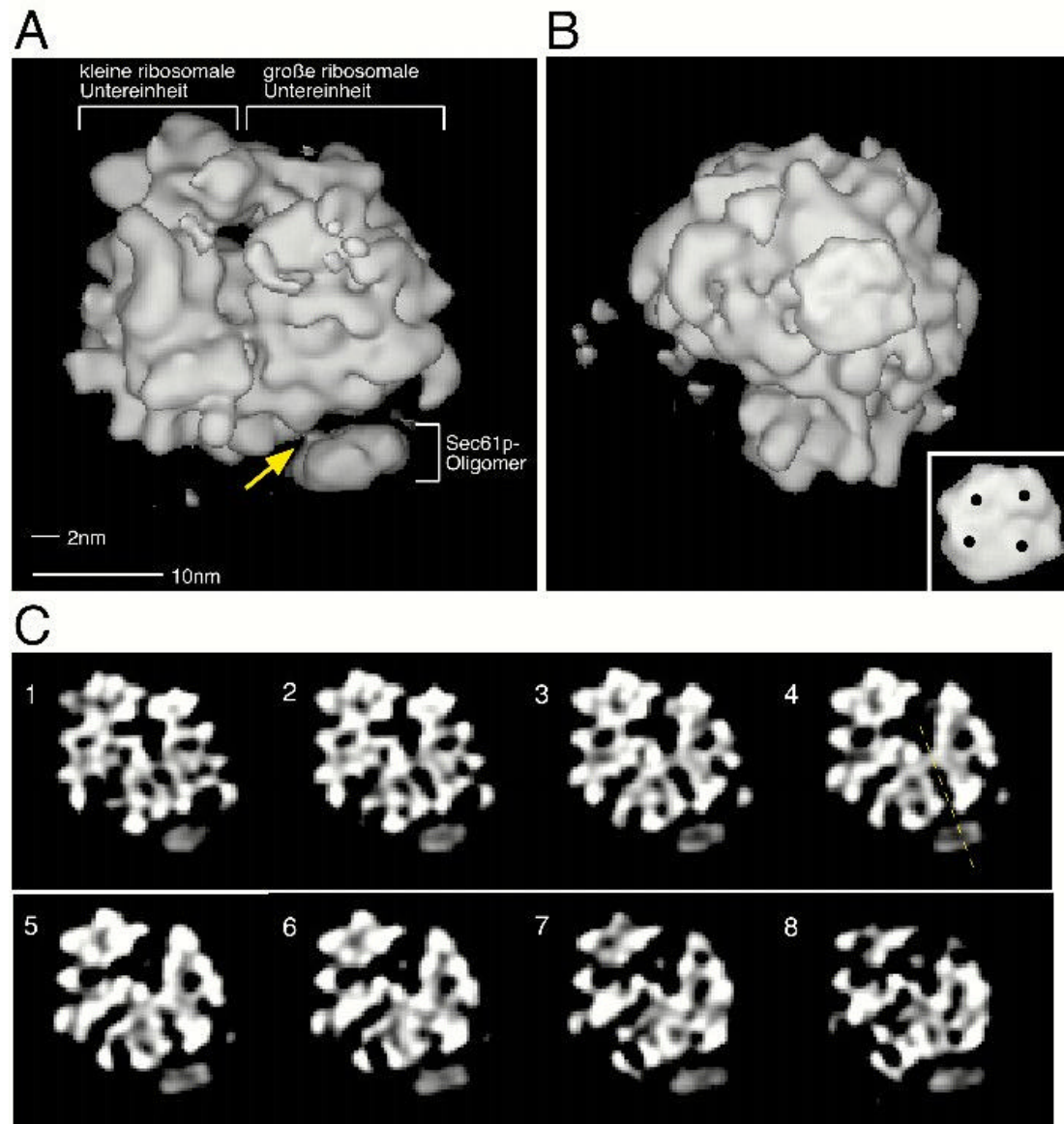
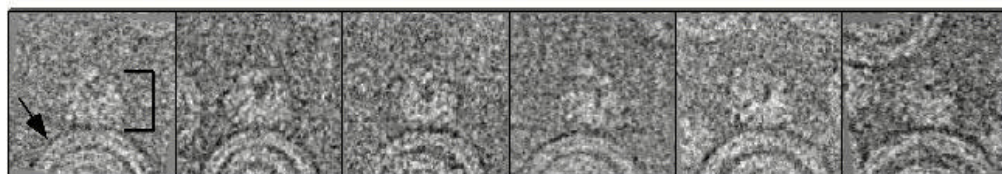


Abbildung 4



## **Anlage 5: Die cytosolischen Interaktionspartner des Prepro-Alphafaktors werden bei seiner Bindung an den Sec-Komplex freigesetzt**

### **Abbildung 1: Interaktionen des Prepro-Alphafaktors im Cytosol**

Um die Umgebung des Prepro-Alphafaktors im Cytosol zu untersuchen, wurde das photoreaktive Lysyl-Derivat anstelle von Lysinen in die Polypeptidkette eingebaut. Neben dem Wildtyp-Prepro-Alphafaktor (wt), der neun Lysine in seiner C-terminalen Hälfte trägt, verwendeten wir 37 Prepro-Alphafaktor-Mutanten mit jeweils einem einzigen Lysin an der angegebenen Position (Pos.). Die Translation der entsprechenden mRNAs wurde in der Gegenwart von  $^{35}\text{S}$ -Methionin und der modifizierten Lysyl-tRNA im Retikulozytenlysat durchgeführt, die Synthese mit Cycloheximid gestoppt und alle Ribosomen durch Zentrifugation entfernt. Ein Teil der Probe wurde mit UV-Licht bestrahlt und anschließend ebenso wie der unbehandelte Teil durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die Bereiche des Gels, in denen die Quervernetzungsprodukte des Prepro-Alphafaktors zu cytosolischen Proteinen beobachtet werden können, sind durch Klammern gekennzeichnet. Deutlich wird, daß jede untersuchte Position des vollständig im Retikulozytenlysat synthetisierten Prepro-Alphafaktors zu einer Vielzahl von cytosolischen Proteinen vernetzt werden kann. An den Positionen 5-28 tritt ein Quervernetzungsprodukt auf, das eine größere Mobilität im SDS-Gel als der Prepro-Alphafaktor selbst besitzt (Pfeil). Diese Beobachtung läßt sich am besten damit erklären, daß die Signalsequenz des Prepro-Alphafaktors im Cytosol eine Schleifenstruktur bildet, deren Abschnitte miteinander vernetzt werden können.

### **Abbildung 2: Der Prepro-Alphafaktor ist Bestandteil verschiedener translokationskompetenter Komplexe**

(A) Im Retikulozytenlysat synthetisierte Prepro-Alphafaktor-Mutanten, die das photoreaktive Lysyl-Derivat entweder an der Position 5 (K5 pp $\alpha$ F, linkes Bild) oder an mehreren Positionen im C-Terminus (wt pp $\alpha$ F, rechtes Bild) tragen, wurden mit UV-Licht bestrahlt und ihre cytosolischen Vernetzungsprodukte anschließend entweder direkt durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert (Bahn 2) oder erst unter nativen Bedingungen mit Antikörpern gegen Hsp70 (Bahn 4) oder Tcp1 $\alpha$  (Bahn 5) immunopräzipitiert. Durch Immunopräzipitationen unter denaturierenden Bedingungen mit den beiden spezifischen Antikörpern konnte gezeigt

werden, daß jeweils die markierte Bande dem Hsp70- bzw. Tcp1 $\alpha$ -Quervernetzungsprodukt des Prepro-Alphafaktors entspricht (nicht gezeigt). Tcp1 $\alpha$ , eine Untereinheit des TRiC-Komplexes, und Hsp70 sind demnach Interaktionspartner des Prepro-Alphafaktors im Retikulozytenlysat. Sie sind sowohl in der Nähe der Position 5 der Signalsequenz als auch in der Nähe der C-terminalen Hälfte des Prepro-Alphafaktors nachweisbar. Da unter nativen Bedingungen mit den Antikörpern gegen Hsp70 bzw. Tcp1 $\alpha$  neben den Hsp70- bzw.

Tcp1 $\alpha$ -Quervernetzungsprodukten auch andere Vernetzungsprodukte des Prepro-Alphafaktors immunopräzipitiert werden konnten, ist der Prepro-Alphafaktor offensichtlich ein Bestandteil verschiedener cytosolischer Komplexe, die entweder das Tcp1 $\alpha$ - oder das Hsp70-Quervernetzungsprodukt enthalten.

Diese Komplexe des Prepro-Alphafaktors konnten im Saccharosegradienten voneinander getrennt werden (B). Dazu wurde der im Retikulozytenlysat quervernetzte K5 pp $\alpha$ F bzw. wt pp $\alpha$ F auf einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten (300-1000mM) aufgetragen und in einem Beckman SW55-Rotor bei 48000rpm für 6 Stunden zentrifugiert. Die Analyse der Fraktionen erfolgte durch SDS-PAGE und Autoradiographie. Die Bereiche des Gels, in denen die Quervernetzungsprodukte des Prepro-Alphafaktors auftreten, sind durch Klammern gekennzeichnet. Das Tcp1 $\alpha$ -Quervernetzungsprodukt (Viereck) ist im Gegensatz zu dem Hsp70-Quervernetzungsprodukt (Dreieck) in einem Komplex mit einem Molekulargewicht von ungefähr 700kD enthalten. Der Prepro-Alphafaktor ist daher wahrscheinlich nicht nur mit einer Untereinheit des TRiC-Komplex assoziiert, sondern mit dem gesamten hetero-oligomeren Chaperon-Komplex. Nur ein einziges der zum K5 Prepro-Alphafaktor vernetzbaren cytosolischen Proteine ist ein Bestandteil aller cytosolischen Komplexe des Prepro-Alphafaktors (Stern).

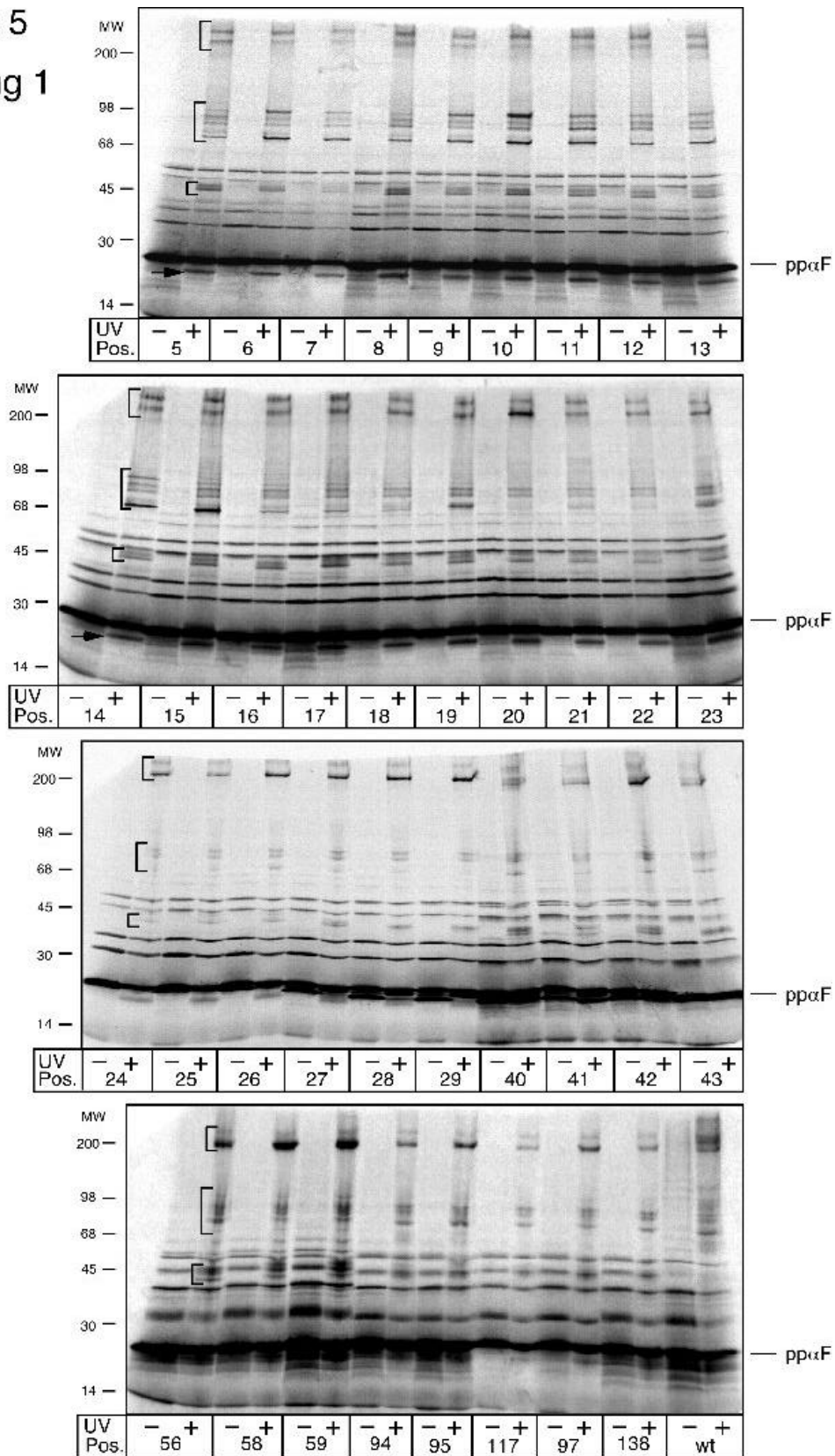
Um zu untersuchen, ob der in den verschiedenen Komplexen vorliegende Prepro-Alphafaktor translokationskompetent ist (C), wurde der im Retikulozytenlysat synthetisierte Wildtyp-Prepro-Alphafaktor, der nur unmodifizierte Lysine trägt, im Saccharosegradienten aufgetrennt. Gleiche Mengen des radioaktiv markierten Prepro-Alphafaktors der einzelnen Fraktionen und des Ausgangsmaterials (load) wurden mit Proteoliposomen, die den Sec-Komplex, Kar2p und ATP enthalten, inkubiert und das nicht translozierte Material anschließend durch die Proteinase K abgebaut. Nach Abbruch der Reaktion mit TCA wurden alle Proben mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die mit einem Phosphorimager bestimmte Menge des proteasegeschützten Prepro-Alphafaktors ist das Maß für die Effizienz der Reaktion

(%Transport). Der Prepro-Alphafaktor der verschiedenen Fraktionen wird genauso effizient in die Vesikel transportiert wie der im vollständigen Retikulozytenlysat vorliegende Prepro-Alphafaktor (load).

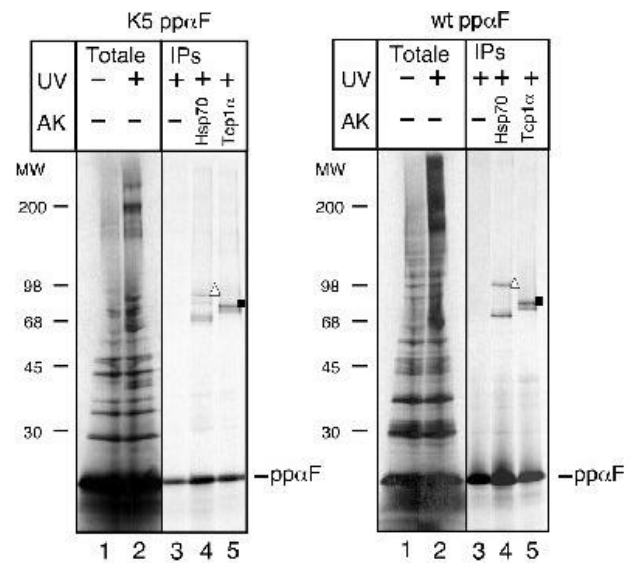
**Abbildung 3: Die cytosolischen Interaktionspartner werden bei der Bindung an den Sec-Komplex vom Prepro-Alphafaktor abgelöst**

Das photoreaktive Lysyl-Derivat wurde wie in (A) beschrieben an verschiedenen Positionen in die Polypeptidkette des Prepro-Alphafaktors eingebaut (Pos.). Die Proben wurden geteilt und eine Hälfte mit Proteoliposomen, die den Sec-Komplex (Sec) enthalten, inkubiert, so daß der Prepro-Alphafaktor effektiv an den Sec-Komplex binden kann. Anschließend wurden alle Proben mit UV-Licht bestrahlt und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Wie bereits in Abbildung 1 gezeigt, treten in Abwesenheit des Sec-Komplexes an allen Positionen des Prepro-Alphafaktors eine Vielzahl cytosolischer Quervernetzungsprodukte auf. Diese sind zum Beispiel für die Positionen 5-14 des Prepro-Alphafaktors durch Klammern hervorgehoben. Durch den Zusatz des Sec-Komplexes nimmt einerseits die Intensität der cytosischen Quervernetzungsprodukte deutlich ab, andererseits tauchen die Quervernetzungsprodukte des Prepro-Alphafaktors zu den Komponenten des Translokationsapparates auf. Die Quervernetzungsprodukte des Prepro-Alphafaktors zu Sec61p sind für die Positionen 5-14 durch Vierecke gekennzeichnet. Auch die interne Schleifenstruktur der Signalsequenz des cytosolischen Prepro-Alphafaktors (Pfeil) wird anscheinend durch die Bindung an den Sec-Komplex aufgelöst. Nur ein einziges cytosolisches Vernetzungsprodukt bleibt offensichtlich unverändert (Stern). Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß die cytosolischen Interaktionspartner des Prepro-Alphafaktors während der Bindung an den Sec-Komplex freigesetzt werden. In Übereinstimmung damit konnte gezeigt werden, daß der an den Sec-Komplex gebundene Prepro-Alphafaktor nur zu den Komponenten des Translokationsapparates, aber nicht zu cytosolischen Proteinen vernetzt werden kann (Anlage 3; Abbildung 3).

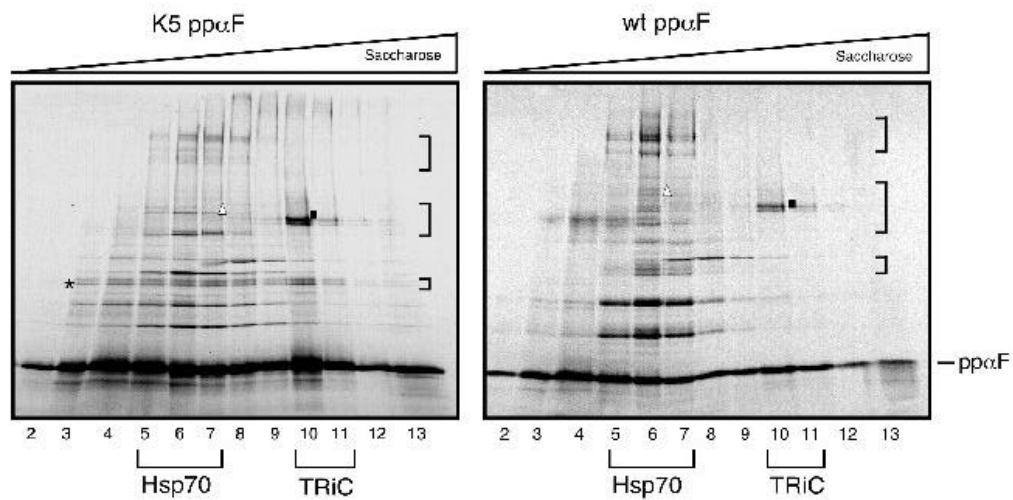
Anlage 5  
Abbildung 1



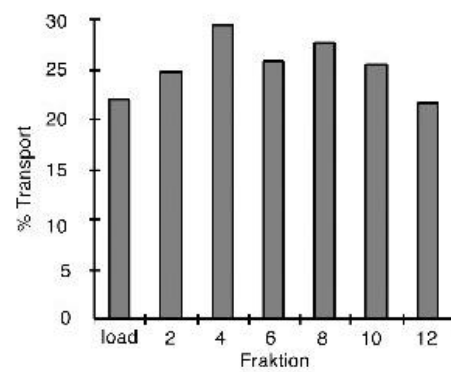
## A



B



C





Anlage 5  
Abbildung 3

